

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record.

BEST AVAILABLE IMAGES

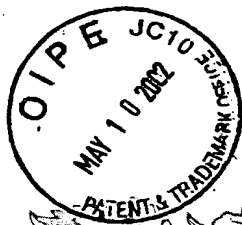
Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원번호 : 특허출원 2001년 제 6229 호
Application Number PATENT-2001-0006229

출원년월일 : 2001년 02월 08일
Date of Application FEB 08, 2001

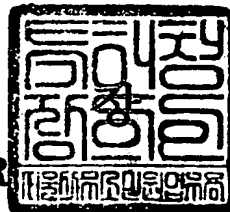
출원인 : 크레아젠 주식회사
Applicant(s) Creagene Inc.



2002 년 01 월 28 일

특 허 청

COMMISSIONER



【 서지사항 】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2001.02.08
【발명의 명칭】	단일쇄 RNA 재조합 벡터내 삽입 서열의 유전적 안정성을 증가시키는 방법
【발명의 영문명칭】	Method for Improving a Genetic Stability for the Insert in Single-Stranded RNA Virus Recombinant Vectors
【출원인】	
【명칭】	크레아젠 주식회사
【출원인코드】	1-1998-109166-9
【대리인】	
【성명】	최홍순
【대리인코드】	9-1998-000576-4
【포괄위임등록번호】	2001-001548-5
【대리인】	
【성명】	김경철
【대리인코드】	9-2000-000251-8
【포괄위임등록번호】	2001-001549-2
【대리인】	
【성명】	양부현
【대리인코드】	9-1999-000421-2
【포괄위임등록번호】	2001-001554-4
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이상구
【성명의 영문표기】	LEE, Sang Gu
【주민등록번호】	721224-1455411
【우편번호】	301-757
【주소】	대전광역시 중구 유천동 현대아파트 111동 1008호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김대유
【성명의 영문표기】	KIM, Dae You

【주민등록번호】	620921-1051910		
【우편번호】	301-150		
【주소】	대전광역시 중구 태평동 삼부아파트 407동 63호		
【국적】	KR		
【발명자】			
【성명의 국문표기】	김기태		
【성명의 영문표기】	KIM,Ki Tae		
【주민등록번호】	590423-1023127		
【우편번호】	305-762		
【주소】	대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 501동 1403호		
【국적】	KR		
【발명자】			
【성명의 국문표기】	배용수		
【성명의 영문표기】	BAE,Yong Soo		
【주민등록번호】	570330-1024635		
【우편번호】	305-761		
【주소】	대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 308동 704호		
【국적】	KR		
【심사청구】	청구		
【미생물기탁】			
【기탁기관명】	생명공학연구소 유전자은행		
【수탁번호】	KCTC 0940BP		
【수탁일자】	2001.02.01		
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】			
【서열개수】	22		
【서열목록의 전자문서】	첨부		
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 최홍순 (인) 대리인 김경철 (인) 대리인 양부현 (인)		
【수수료】			
【기본출원료】	20	면	29,000 원
【가산출원료】	50	면	50,000 원

【우선권주장료】	0	건	0	원
【심사청구료】	29	항	1,037,000	원
【합계】	1,116,000		원	
【감면사유】	소기업 (70%감면)			
【감면후 수수료】	334,800		원	
【첨부서류】	1. 요약서 '명세서(도면)_1통 2.미생물기탁증명서_1통 3.소기업임을 증명하는 서류_1통[사업자등록증, 원천징수이행상황신 고서확인, HTC/TBI 입주 계약서]			

【 요약서 】

【 요약 】

본 발명은 단일쇄 RNA 바이러스 재조합 벡터내 삽입 서열의 유전적 안정성을 개선하기 위한 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 단일쇄 RNA 바이러스 벡터, 특히 폴리오바이러스 벡터를 이용하여 생백신을 만들 때 삽입되는 외래 DNA 서열의 G/C 양의 분포를 전체 외래 DNA 서열에 걸쳐 균일하게 분포되도록 변이시키는 단계와 위 목적을 위해서 결합반응-부재 PCR 방법을 이용하여 수형이 없이도 500 bp 길이의 삽입 DNA 서열을 합성하는 방법을 포함하는 폴리오바이러스 벡터를 이용한 재조합 생백신의 유전적 안정성을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법은 종래의 폴리오바이러스 벡터를 이용한 재조합 생백신보다 다양한 항원결정부위를 포함할 수 있는 생백신의 제조 방법을 제공하고 도입된 백신 유전자의 유전적 안정성을 크게 개선시키는 방법을 제공하므로 재조합 생백신 개발을 위한 폴리오바이러스 벡터 및 단일쇄 RNA 바이러스 재조합 벡터의 유용성을 크게 향상시킨다.

【 대표도 】

도 11a

【 색인어 】

단일쇄 RNA 바이러스, 폴리오바이러스, 사빈 1형, 재조합 벡터, 유전적 안정성, G/C 양

【 명 세 서 】

【 발명의 명칭 】

단일쇄 RNA 재조합 벡터내 삽입 서열의 유전적 안정성을 증가시키는 방법 {Method for Improving a Genetic Stability for the Insert in Single-Stranded RNA Virus Recombinant Vectors}

【 도면의 간단한 설명 】

도 1은 본 발명에 이용되는 RPS-Vax 벡터의 유전자 지도;

도 2는 본 발명의 방법에 따라 키메라 폴리오바이러스를 제조하는 과정을 나타낸 모식도;

도 3a는 PV 2-118이 도입된 RPS-Vax의 유전적 안정성을 확인하는 RT-PCR 결과를 나타내는 전기영동 사진;

도 3b는 PV 2.3-131이 도입된 RPS-Vax의 유전적 안정성을 확인하는 RT-PCR 결과를 나타내는 전기영동 사진;

도 3c는 HIV-1 mV3이 도입된 RPS-Vax의 유전적 안정성을 확인하는 RT-PCR 결과를 나타내는 전기영동 사진;

도 4a는 HIV-1 env-98, HIV-1 env-83, HIV-1 env-71 및 HIV-1 env-98/M의 서열 특징을 나타내는 그림;

도 4b는 HIV-1 env-98/M에서 본 발명의 기본 원칙에 따라 변이를 발생시킨 부분의 특징을 나타내는 그림;

도 4c는 HIV-1 env-98과 HIV-1 env-98/M의 G/C 양 분포를 나타내는 그래프;

도 5는 HIV-1 env-98, HIV-1 env-83, HIV-1 env-71 및 HIV-1 env-98/M이 각각 도입된 RPS-Vax의 유전적 안정성을 확인하는 RT-PCR 결과를 나타내는 전기영동 사진;

도 6a는 SIV p27-150 및 SIV p27-167이 각각 도입된 RPS-Vax의 유전적 안정성을 확인하는 RT-PCR 결과를 나타내는 전기영동 사진;

도 6b는 SIV p27-150 및 SIV p27-167이 각각 도입된 RPS-Vax의 단백질 안정성을 확인하는 웨스턴 블롯팅 사진;

도 7은 SIV p27-150 및 SIV p27-167이 각각 도입된 RPS-Vax를 Tg-PVR 위에 부여한 후 1일부터 4일까지의 인 비보에서의 유전적 안정성을 확인하는 RT-PCR 결과를 나타내는 전기영동 사진;

도 8은 본 발명에 따라 제작된 OPV-150의 서열의 특징을 나타내는 그림;

도 9는 OPV-150을 인코딩하는 DNA 서열을 연결반응-무재(ligation-free) PCR로 제조하기 위하여 이용된 프라이머 8개의 서열 및 그 특징을 나타내는 그림;

도 10은 OPV-150을 인코딩하는 DNA 서열을 연결반응-무재(ligation-free) PCR로 제조한 산물을 확인한 전기영동 사진;

도 11a는 본 발명에 따라 인위적으로 제작된 OPV-150이 도입된 RPS-Vax의 유전적 안정성을 확인하는 RT-PCR 결과를 나타내는 전기영동 사진; 및

도 11b는 본 발명에 따라 인위적으로 제작된 OPV-150이 도입된 RPS-Vax의 단백질 안정성을 확인하는 웨스턴 블롯팅 사진.

【 발명의 상세한 설명 】

【 발명의 목적 】

【 발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술 】

<18> 본 발명은 단일쇄 RNA 바이러스를 재조합 생백신 벡터로 이용할 때 삽입 외래 DNA의 유전적 안정성을 향상시키는 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 유전적 안정성이 개선된 단일쇄 RNA 바이러스 재조합 벡터의 제조, 특히 유전적 안정성이 향상된 폴리오바이러스 벡터를 이용한 재조합 생백신의 제조방법에 관한 것이다.

<19> 생 약독화 바이러스 백신(live attenuated viral vaccines)은 다른 종류의 백신에 비해 저렴한 제조비용, 고 면역원성, 및 용이한 투여방법 등 다수의 이점을 갖는다. 한편, 상기 생 약독화 바이러스 백신의 또 다른 이점 중 하나는 바이러스 지놈의 유전자 서열 및 분자 유전학적 연구가 잘 되어 있어서 재조합 DNA 기술을 이용한 바이러스 지놈의 유전자 조작이 가능하다는 것이다(Rolph, M. S. and I. A. Ramshaw., *Curr. Opin. In Immunology* 9:517-524(1997)). 상기 지놈 조작의 주요한 개념은 원하는 백신항원을 코딩하는 외래 유전자를 바이러스의 생존력에는 영향을 미치지 않으면서 약독화된 바이러스 지놈에 삽입하는 것이다. 이렇게 만들어진 재조합 바이러스는 벡터뿐 아니라 도입된 백신 유전자에 대해서도 면역을 유도할 수 있는 효과적인 복합백신으로 작용할 수 있다. 이는 삽입된 DNA가 바이러스 지놈과 함께 RNA 형태로 바뀌어 세포안으로 들어가면, 복제, 발현, 절단 (processing) 과정을 거쳐 바이러스와 함께 세포 표면 혹은 세포 밖으로 방출될 때 모바이러스(parental virus)에 대한 면역 반응의 유도과 함께 삽입된

유전자의 발현 단백질에 대해서도 유사한 기전에 의해 면역반응이 유발되기 때문이다. 그러나, 상기 생 약독화 바이러스 백신의 유용성은 도입할 수 있는 외부 유전자의 크기가 한정되어 있고, 세포 내에서의 복제능력이나, 계대(passage) 시 유전적 안정성, 재조합 바이러스의 병원성 회복 능력과 같은 다양한 인자에 의해서 크게 제한될 수 있다.

<20> 폴리오바이러스는 높은 복제 속도 및 라이프 사이클에서의 잠복기 부재, 점막면역의 유도 능 많은 장점을 갖고 있어서 백신 개발의 벡터로 사용하기 위해 많은 연구가 진행되었다. 이를 통해 폴리오바이러스의 약독화수의 안정성, 투여의 용이성, 그리고 효과적인 전신면역과 점막면역 유도능 능이 지난 수십년 동안 제시되어 왔다. 한편, 다른 바이러스에 비해 폴리오바이러스는 지놈 크기가 작아 벡터로 개발시 도입할 수 있는 외부 유전자의 크기에 한계가 있다. 이는 유전자 재조합 기술을 이용하여 폴리오바이러스 벡터를 개발할 경우 이를 이용해 재조합 생백신을 개발하는데 수요한 장애요인으로 작용한다.

<21> 전형적인 피코나비리대(

Picornaviridae)로서의 폴리오바이러스는 외막이 없고, 7.44 kb의 뉴클레오티드로 구성된 (+)-단일쇄 RNA를 지놈으로 갖는 바이러스이다. 폴리오바이러스는 RNA 바이러스의 특징인 에러-유발 복제 기작 및 후손 RNA 사이의 다발성 유전자 재조합에 의해 유전적 변이가 매우 높게 발생한다. 지놈은 내부 리보솜 초기 결합부위(internal ribosomal entry site: IRES)와 이어지는 단일가닥의 긴 다중단백질(polyprotein)을 코딩하는 단일의 오픈 리딩 프레임에 포함한다. 상기 IRES 요소는 다중단백질의 발현을 조절하고, 상기 다중 단백질은 3종의 바이러스-코딩 프로테아제(2A^{pro}, 3C^{pro} 및 3CD^{pro})에 의해 다수의 구조단백질 및 기능성 단백질로 절단된다. 주요한 바이러스 프로테아제인 3C^{pro}와 그의 전구체인 3CD^{pro}는 서열 특이성을 가지고 다중단백질의 특정부위를 (AXXQ/G)인식하여 절단한다. 한편 마이너 프로테아제인 2A^{pro}는 P1과 P2 부위 사이의 특정 접합 위치를 절단한다. 정확하게, 4종의 캡시드 단백질(VP1, VP2, VP3 및 VP4)이 모여서 하나의 캡소머를 형성하고, 캡소머 60 카피가 일정하게 결합하여 대칭으로 정이십면체의 견고한 바이러스 캡시드를 형성하고 내부에 RNA 지놈이 자리잡게 된다. 상술한 폴리오바이러스의 발현, 절단, 복제 및 결합은 자동적인 과정이므로, 완전한 바이러스는 허용 숙주세포내에서 신속하게 증식될 수 있다.

<22> 폴리오바이러스 백신 벡터의 개발에 있어서 가장 발전된 기술은 poliovirus 벡터에 특정 제한효소 인식부위와 바이러스 유래 3C 단백질 분해 효소의 절단 부위를 인위적으로 N-말단이나 P1/P2 사이(캡시드 단백질과 기능성 단백질 사이의 접합 위치)에 삽입하여 경구용 생백신으로 사용할 재조합 바이러스를 손쉽게 생산하는 방법이다 (Andino, R., D. et al., *Science* 265:1448-1451(1994)). 따라서, 외래 삽입물은 바이러스의 다중단백질과 함께 번역된 다음, 프로테아제 중 하나인

3C^{pro}에 의해 절단되어 세포질내에 유리된 형태로 남아 있게 된다. 상기 방법에 기초한 다수의 재조합체는 외래의 항원에 대한 체액성, 세포성 및 점막성 면역을 나타낼 뿐만 아니라, 증가된 유전적 안정성을 갖는 것으로 보고되었다(Crotty, S., et al, 73:9485-9495(1999); Mandl, S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* 95:8216-8221(1998)).

<23> 그러나, 상기 방법은 여러가지 장점에도 불구하고 재조합 바이러스가 복제 단계에서 증식력이 떨어지고, 재조합체 내의 외래 유전자가 유전적으로 불안정하다는 최근의 논문 발표에 의해 도전을 받고 있다(Mueller, S., and E. Wimmer., *J. Virol.* 72:20-31(1998)). 이러한 연구결과가 어떤 원인에 의해서 생기는 지 여부는 미지로 남아 있지만, 상기 연구는 기존의 방법을 이용하면 플리오바이러스 캡시드내에 10 kDa 이상의 외래 삽입물을 수용하는 것은 매우 힘들다는 것을 보여주고 있다.

<24> 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 특허문헌 및 논문이 참조되고 그 인용은 괄호내에 표시하였다. 인용된 특허 및 논문의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준이 보다 명확하게 설명된다.

【 발명이 이루고자 하는 기술적 과제 】

<25> 본 발명자들은 상술한 플리오바이러스 벡터의 문제점들을 해결하는 방안으로

폴리오바이러스에 삽입되는 외래 DNA 서열의 G/C 양을 증가시키고 아미노산의 변화없이 G/C 분포를 균일하게 분포되도록 조절한 경우에는 폴리오바이러스 벡터를 이용한 생백신의 유전적 안정성이 크게 증가됨을 확인하게 되었고, 또한 외래 DNA의 발현 단백질 크기를 17 kDa까지 안정화시키는 방법을 개발함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

<26> 따라서, 본 발명의 목적은 단일쇄(single stranded) RNA 바이러스 재조합 벡터내의 삽입 외래 DNA의 유전적 안정성을 증가시키는 방법을 제공하는 데 있다.

<27> 본 발명의 다른 목적은 폴리오바이러스 재조합 벡터내의 삽입 외래 DNA의 유전적 안정성을 증가시키는 방법을 제공하는 데 있다.

<28> 본 발명의 또 다른 목적은 연결반응-무재(ligation-free) PCR 방법을 이용한 DNA의 제조방법을 제공하는 데 있다.

<29> 본 발명의 다른 목적은 외래 DNA 서열의 유전적 안정성이 개선된 단일쇄 RNA 바이러스 재조합 벡터 및 폴리오바이러스 재조합 벡터를 제공하는 데 있다.

【 발명의 구성 및 작용 】

<30> 본 발명은 단일쇄(single stranded) RNA 바이러스 재조합 벡터에 삽입되는 외래 DNA 염기 서열의 G/C 양의 분포를 전체 외래 DNA 서열에 걸쳐 균일하게 분포되도록 조작하는 단계를 포함하는, 단일쇄 RNA 바이러스 재조합 벡터내 삽입 서열의 유전적 안정성을 증가시키는 방법을 제공한다.

<31> 본 발명의 다른 양태는 폴리오바이러스 재조합 벡터에 삽입되는 외래 DNA 서열의 G/C 양의 분포를 전체 외래 DNA 서열에 걸쳐 균일하게 분포되도록 조작하는 단계를 포함

하는 폴리오바이러스 재조합 벡터내의 삽입 서열의 유전적 안정성을 개선하는 방법을 제공한다.

<32> 이와 같은 본 발명을 상세하게 설명하면 다음과 같다:

<33> 본 발명자들은 효율적이며 다용도 목적을 갖는 폴리오바이러스 백신 벡터 시스템을 개발하였고 (대한민국 특허출원 제 1998-32198호), 상기 개발된 벡터 시스템에 외래 DNA를 삽입시켜서 만든 생백신의 유전적인 안정성을 더욱 보완하기 위하여 본 발명을 완성하였다.

<34> 한편, 폴리오바이러스 벡터를 실제적으로 적용시키기 위해서는 몇 가지 사항이 주의적으로 고려되어야 한다. 첫째, 폴리오바이러스 벡터로 개발한 생백신이 사람에게 이용되는 경우에는 안정성이 고려되어야 한다. 이는 생백신이 약독화수로서 계대 (passage)가 진행될수록 돌연변이의 축적에 의해서 야생형 바이러스로 전환될 수 있기 때문이다. 이러한 위험은 사빈 1형 폴리오바이러스수를 이용하면 용이하게 극복될 수 있다. 상기 사빈 1형 폴리오바이러스는 맹독성의 야생형에 비해 다중 복합돌연변이를 포함하고 있어서 병원성이 있는 야생 독성수로 전환될 확률이 거의 없는 것으로 알려졌다. 사빈 1형 폴리오바이러스는 1961년에 개발된 이후 경구형 백신으로서 전세계적으로 광범위하게 사용되고 있지만, 현재까지 부작용이 보고된 예가 한번도 없었다. 반면, 사빈 1, 2, 3형을 모두 포함하는 OPV의 경우 백신 부작용으로 발생한 소아마비의 예가 미국에서만 매년 5-10건씩 지속적으로 보고되고 있으며 이들은 대부분 사빈 2형, 3형이 돌연변이에 의해 야생수로 전환되어 일어난 것으로 밝혀지고 있다. 이와 같은 이유 때문에 미국 등 몇몇 선진국에서는 최근에 소아마비의 접촉 프로그램을 먹는 생백신(OPV)에

서 사백신(IPV)으로 바꾸거나 사백신 투여 후 생백신을 투여하여 생백신의 부작용 가능성을 줄이는 백신 프로그램을 시행하고 있다. 본 발명자들은 사빈 1형을 유전자 조작하여 백신 벡터로 개발하고 이를 국내외에 특허출원 하였으며 (대한민국 특허출원 제 1998-32198호, 미합중국 특허출원 제 09/284,349호, 캐나다국 특허출원 2.268.737, 일본국 특허출원 제 ㄱ11-511995호, 중국 특허출원 제 98801323.1호, 유럽 특허출원 제 89 938 993.7호, 브라질국 특허출원 제 P19806084-8호) 이를 이용해 다양한 항원성 도메인을 도입한 재조합 바이러스를 생산하고 재조합 바이러스 증식 시 도입된 DNA의 발현을 확인함으로써 본 벡터를 이용한 점막면역용 백신개발 가능성을 제시한 바 있다 (Jung, H., and Y.-S. Bae.,

J. Biochem. Mol. Biol. 31:432-443(1998). 누 번째로 고려되어야 할 사항은 삽입 DNA 서열의 유전적 안정성이다. 삽입 DNA 서열의 계대 시 유전적 안정성을 조절하는 분자적 기전은 현재까지 제대로 정립이 되어 있지 않다. 삽입된 DNA 서열의 유전적 안정성은 도입할 DNA 염기서열만으로는 파악하기 어렵고 많은 시행착오를 통한 축적된 경험으로 해결해야 하는 사항이었다. 만약 실험을 개시하기 전에 삽입 DNA 서열의 안정성을 평가할 수 있다면, 플리오바이러스를 포함한 단일쇄 RNA 바이러스 재조합 벡터를 이용한 백신의 응용은 보다 가속화될 것이다. 이와 같은 삽입 DNA 서열의 안정성에 관한 문제는 플리오바이러스를 이용한 재조합 벡터에만 국한된 것은 아니고, 단일쇄 RNA 바이러스를 재조합 벡터로 이용하여 백신을 개발하는 데 일반적으로 발생하는 문제이다. RNA 바이러스는 숙주세포에 들어가서 복제할 때 RNA 의존성 RNA 중합효소를 이용하여 복제되는 데, 이 효소는 DNA 복제 효소와는 달리 변이 빈도가 높아서 다양한 돌연변이 바이러스를 생성하게 된다. RNA 바이러스를 DNA로 전환하여 재조합 벡터로 개발하고 외부 DNA를 삽입할 때는 바이러스 캡시드의 수용능력에 따라서 원래 바이러스의 지놈 크기를 넘어서는 DNA 부위에 다양한 형태의 결손을 지닌 바이러스들이 만들어진다. 불온 바이러스 지놈부위에 결손이 일어난 것도 만들어 질 수 있지만 이런 바이러스들은 성장속도에 영향을 미침으로써 자연 선택적으로 사라지며, 원래 바이러스의 성장속도에 크게 영향을 주지 않는 부분, 즉 외부에서 삽입한 DNA 부위의 결손을 일으킨 바이러스들이 선택적으로 만들어지게 된다. 따라서 본 명세서에 개시된 방법은 구체적으로는 플리오바이러스를 재조합 벡터로 이용하여 생백신을 개발할 때 외부에서 삽입한 DNA 서열의 유전적 안정성을 높이는 방법으로 개발되었지만, 원리적으로는 단일쇄 RNA 바이러스를 cDNA로 전

환 후 재조합 벡터로 개발해서 외부 DNA를 클로닝할 때 생기는 안정성 문제를 해결하는데 보편적으로 이용될 수 있다.

<35> 상술한 것 중 누 번째 사항을 해결하기 위하여, 본 발명자들은 다양한 항원으로 구축된 재조합 플리오바이러스들을 만들고 이를 이용하여 안정성을 조절하는 삽입 DNA 서열내의 여러 요소들을 조사하였다.

<36> 본 명세서에 기재되어 있는 용어 중 "바이러스 (재조합) 벡터의 유전적 안정성"은 바이러스 (재조합) 벡터, 특히 생백신의 용도로서의 바이러스 재조합 벡터내에 삽입된 외래 DNA 서열의 유전적 안정성을 증가시키는 것을 의미한다. "유전적 안정성(genetic stability)"은 단일쇄 RNA 바이러스 재조합 벡터, 특히 재조합 플리오바이러스 재조합 벡터가 한 숙주에서 다른 숙주로 전파되고 증식될 때 삽입된 외래 DNA 서열을 계속적으로 유지함으로써 그 DNA에 코딩되어 있는 특정 항원성 결정 부위에 대한 동일한 면역반응을 유도할 수 있게 하는 것을 의미한다. 상기 용어는 "계대 안정성(passage stability)"과 동일한 의미로서 혼용될 수 있다. 또한, 용어 "단백질 안정성"은 상기 유전적 안정성을 단백질 수준에서 표현하는 용어이다. 유전적 안정성은 좁은 의미로는 계대 안정성의 의미로 국한되어 사용되지만, 특허청구범위에서 사용될 때의 의미는 삽입된 외래 DNA 서열에 의해서 코딩된 단백질의 안정성까지 포함하는 넓은 의미를 포함한다.

<37> 본 발명에 따르면, 폴리오바이러스 재조합 벡터내에 삽입되는 외래 DNA 서열의 유전적 안정성은 기본적으로 외래 DNA 서열의 G/C 양의 분포를 전체 외래 DNA 서열에 걸쳐 균일하게 분포되도록 유전자를 조작함으로써 이루어진다. 상기 변이는 외래 DNA에 의해 코딩되는 폴리펩타이드의 아미노산 서열을 실질적으로 변화시키지 않아야 한다. 특히, 외래 DNA에 의해 코딩되는 것이 항원성 결정 부위인 경우에는 항원성에 영향을 미치지 않도록 DNA를 유전자 조작하여야 한다.

<38> 한편, 상기 외래 DNA 서열의 G/C 양을 균일하게 분포시키고 전체 삽입 DNA 서열의 G/C 양이 40% 이상이 되도록 변이시키면 삽입된 DNA 서열의 유전적 안정성을 증가시킬 수 있다.

<39> 하기의 실시예에서 확인할 수 있듯이, 삽입 외래 DNA 서열에 A/T 풍부 서열(rich sequence)이 있는 경우에는 삽입 외래 DNA 서열의 RNA 전사체(transcript) 구조 안정성이 크게 저하되고, 이는 이웃하는 부위의 위치-특이적 결실을 초래한다. 따라서, 상기 외래 DNA 서열의 G/C 양을 균일하게 분포되도록 변이시키는 것은 상기 외래 DNA 서열의 국부적인(local) A/T 풍부 서열의 G/C 양을 증가시켜 A/T 풍부 서열을 회피함으로써 실시될 수 있다.

<40> 일반적으로 G/C 함량이 높으면 국부적인 A/T 풍부 서열이 나타날 확률이 거의 없다. 이에 대한 기준으로서 대략적으로 G/C 함량이 40-50% 이상이면 삽입 유전자에 대한 안정성이 존재한다고 할 수 있다. 따라서 G/C 함량이 50% 이상일 때에는 일반적

으로 국부적인 A/T 풍부 서열의 존재를 걱정할 필요가 없다. 중요한 점은 절대적인 G/C 함량보다는 전체적으로 균능한 G/C 서열의 분포에 의한 국부적인 A/T 풍부 서열이 나타나는 것을 피하는 것이 우선적이다. 또한, 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 폴리오바이러스 재조합 벡터에 삽입되는 외래 DNA 서열의 길이는 480 bp 이하이고, 보다 바람직하게는 460 bp 이하이며, 가장 바람직하게는 450 bp 이하이다. 삽입되는 DNA의 길이가 450 bp를 초과하게 되면 G/C 함량이 40% 이상이 되어도 삽입된 유전자의 안정성은 감소한다. 이는 아마도 바이러스 캡시드 안에 수용할 수 있는 함량이 한계치에 도달하기 때문에 생기는 것으로 주측된다. 삽입되는 염기 약 450 bp는 폴리오바이러스 전체 염기 7440 bp의 6%에 해당하는 양으로서 그 이상을 수용하는 것은 어려울 것으로 주측된다.

<41> 본 발명에 있어서, 삽입되는 외래 DNA 서열의 유전적 안정성을 증가시키기 위한 변이는 코딩되는 아미노산 서열을 실질적으로 변경시키지 않는 것이 바람직하고, 유전자 코드의 축퇴성(degeneracy)을 이용한 침묵 변이(silent mutation)로 실시하는 것이 바람직하다.

<42> 본 발명의 방법에 따라 유전자조작 삽입 DNA 서열의 RNA 전사체는 압축된 RNA 형태를 가지며, 전고한 바이러스의 캡시드내에 용이하게 포막될 것으로 주측된다.

- <43> 본 발명의 폴리오바이러스 재조합 벡터는 혈청형으로 구분되는 폴리오바이러스 1형(마호니: Mahoney), 폴리오바이러스 2형(랜싱: Lansing) 및 폴리오바이러스 3형(레온: Leon)으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것이다. 또한, 상기 폴리오바이러스 재조합 벡터는 사빈에 의해 구축된 약독화수인 사빈 1형, 사빈 2형 및 사빈 3형으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것을 이용하는 것이 더욱 바람직하며, 가장 바람직하게는 병원성으로 전환되는 확률이 가장 낮은 사빈 1형을 이용하는 것이다.
- <44> 본 발명의 폴리오바이러스 재조합 벡터는 일반적인 백신 벡터로의 유용성이 가장 중요한 바, 상기 폴리오바이러스 재조합 벡터에 삽입될 수 있는 외래 유전자 염기서열은 HIV-1, HIV-2, HCV, HBV, HPV(인간 파필로마바이러스), HSV(대상포진 바이러스), 로타바이러스(Rotavirus), 인플루엔자 바이러스 및 유행성 출혈열 바이러스 등과 같은 면역학적으로 중요한 병원성 바이러스의 항원성 결정 부위를 코딩하는 서열을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- <45> 본 발명에 있어서, 폴리오바이러스 재조합 벡터에 삽입되는 외래 DNA 서열은 바람직하게는 폴리오바이러스 재조합 벡터의 5'-말단에 삽입된다. 이와 같은 전략은 본 발명자들의 대한민국 특허출원 제 1998-32198호에 개시되어 있는 것으로서, 외래 DNA 서열에 의해 코딩되는 단백질은 다중단백질의 N-말단에 융합된다. 또한, 상기 외래 DNA 서열은 보다 바람직하게는 폴리오바이러스 재조합 벡터의 5'-말단에 인위적으로 형성된 1종 이상의 제한효소 절단부위를 포함하는 클로닝 부위에 삽입되며, 상기 클로닝 부위는 삽입될 수 있는 다양한 DNA 서열을 참작하여 다중 클로닝 부위인 것이 보다 바람직하다.

상기 폴리오바이러스의 클로닝 부위의 3' 쪽에는 폴리오바이러스의 지놈이 코딩하는 내인성 프로테아제 절단부위가 추가적으로 형성되어 있는 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는 3C-프로테아제 절단부위가 추가적으로 형성되어 있는 것이다.

<46> 한편, 상술한 본 발명의 폴리오바이러스 벡터를 이용한 생백신의 유전적 안정성을 개선하는 방법은 폴리오바이러스가 속해 있는 단일쇄 RNA 바이러스의 다른 벡터에도 적용될 수 있다는 것은 당업자에게 자명한 것이다. 즉, 단일쇄 RNA 바이러스 벡터에 삽입되는 외래 DNA 염기 서열을 상술한 바와 같이 유전자 조작하는 경우에는 단일쇄 RNA 바이러스 벡터내의 삽입 서열의 유전적 안정성을 개선시킬 수 있다. 상기 단일쇄 RNA 바이러스 벡터는 폴리오바이러스 재조합 벡터, 황열 바이러스(Yellow fever virus) 벡터, 베네수엘라 에퀀 엔세팔리티스 바이러스(Venezuelan equine encephalitis virus) 벡터, 루벨라 바이러스(Rubella virus) 벡터, 콕사키바이러스(Coxsackievirus) 벡터 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

<47> 본 발명의 다른 양태는 (a) 폴리오바이러스 지놈 유전자; (b) 상기 지놈 유전자의 5' 쪽에 인위적으로 형성되어 있고 제한효소 절단 부위를 포함하는 클로닝 부위; 및 (c) 상기 폴리오바이러스 지놈 유전자와 클로닝 부위의 사이에 인위적으로 형성된 3C-프로테아제 절단부위를 포함하는 사빈 1형 폴리오바이러스 재조합 벡터의 상기 클로닝 부위에 삽입되는 외래 DNA 염기 서열의 G/C 양의 분포를 전체 외래 DNA 염기 서열에 걸쳐 균일하게 하고 동시에 G/C 양을 40% 이상으로 증가되도록 유전자를 조작하는 단계를 포함하

는 플리오바이러스 재조합 벡터내의 삽입 서열의 유전적 안정성을 개선하는 방법을 제공한다.

- <48> 본 발명의 플리오바이러스 재조합 벡터에 포함되는 플리오바이러스 지놈은 야생형인 마호니(1형), 랜싱(2형), 레온(3형) 플리오바이러스 지놈 및 사빈 1형, 2형, 3형 플리오바이러스 지놈 뿐만 아니라, 플리오바이러스의 생존성(viability)에 영향을 미치지 않는 변이가 있는 플리오바이러스 지놈도 포함한다.
- <49> 한편, 특정 백신의 항원성을 향상시키기 방법으로 반복된 아미노산 서열을 갖는 멀티머성 항원성 결정 부위(에피토프)를 제작하는 것이 일반적이다. 그러나, 상기 멀티머성 에피토프를 코딩하는 반복되는 염기 서열이 외래 DNA 서열에 포함되어 있는 경우에는, 재조합 플리오바이러스의 계대가 진행될수록 유전적 안정성이 없어 일반적으로 반복 서열의 결실이 초래된다.
- <50> 플리오바이러스 벡터에 있어서 상기한 멀티머성 에피토프의 유전적 안정성을 개선하기 위하여, 본 발명은 (a) 플리오바이러스 지놈 유전자; (b) 상기 지놈 유전자의 5' 쪽에 인위적으로 형성되어 있고 제한효소 절단 부위를 포함하는 다중 클로닝 부위; 및 (c) 상기 플리오바이러스 지놈 유전자와 클로닝 부위 뒤에 인위적으로 도입한 3C-프로테아제 절단부위를 포함하는 사빈 1형 플리오바이러스 벡터의 상기 다중 클로닝 부위에 삽입되는 단백질 수준에서 반복된 아미노산 서열을 갖는 멀티머성 항원 결정부위를 코딩하는 외래 DNA 염기 서열의 G/C 양의 분포를 전체 외래 DNA 염기 서열에 걸쳐 균일하게 하

고 유전자 코드의 축퇴성을 이용하여 DNA 수준에서 반복된 염기 서열을 회피하도록 유전자를 조작하는 단계들 포함하는 플리오바이러스 재조합 벡터내의 삽입 서열의 유전적 안정성을 개선하는 방법을 제공한다.

<51> 상기 본 발명의 방법에 의해 제조되는 플리오바이러스 벡터가 사람에게 적용되는 백신으로 이용되는 경우에는 상기 멀티머성 항원결정부위를 코딩하는 DNA 서열은 다음과 같은 원칙에 따라 유전자 조작하여 제작하는 것이 바람직하다: 첫째, 플리오바이러스의 숙주인 사람에게 있어서 덜 이용되는 코돈의 사용을 피한다. 둘째, 선호성이 큰 코돈 중에서는 G/C 양이 큰 코돈을 이용한다. 셋째, 최종적으로 전체 염기 서열에서 A/T 풍부 서열 등과 같은 국부적인 반복서열을 피한다.

<52> 상기 반복된 항원성 결정 부위를 코딩하는 DNA 서열은 상술한 원칙에 적합하도록 본 발명자들이 개발한 연결반응-부재(ligation-free) PCR 방법으로 용이하게 얻을 수 있다. 따라서, 본 발명의 다른 양태는 (i) 다음과 같은 특징을 가지며 수형과 프라이머의 역할을 하는 다수의 DNA 단편을 합성하는 단계: (a) 상기 다수의 프라이머는 최종적으로 제조하고자 하는 DNA 염기 서열을 적합한 크기로 분할하여 디자인된 것이고; 및 (b) 상기 다수의 프라이머의 5'- 및/또는 3'-말단은 다음 프라이머의 말단 서열에 대하여 상보적인 염기서열을 포함한다; (ii) 증폭 단계에서 이용되는 양 말단의 프라이머를 나머지 프라이머와 비교하여 높은 농도로 하여 상기 합성된 다수의 프라이머를 혼합하는 단계; (iii) 다음과 같은 연쇄적인 PCR 반응을 포함하는 원하는 크기의 멀티머성 항원 결정 부위를 코딩하는 외래 DNA 서열의 전장을 제조하는 숙성 단계: 92℃-96℃에서 20-40초 동안의 변성, 25℃-40℃에서 20-40초 동안의 어닐링 및 68℃-75℃에서 30초-55초 동안

의 합성 반응; 그리고, (iv) 다음과 같은 연쇄적인 PCR 반응을 포함하는 상기 제조된 DNA 서열의 전장을 증폭하는 단계: 92℃-96℃에서 20-40초 동안의 변성, 68℃-75℃에서 40초-1분 10초 동안의 어닐링 및 합성 반응을 포함하는 연결반응-부재 PCR 방법을 이용한 DNA 서열의 제조 및 증폭방법을 제공한다.

<53> 한편, 숙성 단계에서 발생하는 중간 크기의 생성물은 증폭 단계에서의 높은 어닐링 온도 및 숙성 단계의 짧은 사이클 때문에 최종 증폭단계에서는 거의 증폭되지 않거나 또는 극미량만 증폭된다. 따라서, 상기한 방법을 따르면 한번의 PCR 시행으로 최종 생성물만을 효과적으로 증폭하게 되고, 수형준비 및 연결반응을 필요로 하지 않게 된다.

<54> 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 상기 혼합 단계에서 이용되는 양 말단의 프라이머와 나머지 프라이머의 농도비는 1:3 내지 1:8이고, 보다 바람직하게는 1:3 내지 1:6이며, 가장 바람직하게는 1:4이다. 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 상기 프라이머의 5'- 및/또는 3'-말단에 있는 상보적인 염기서열은 길이가 8-20 머이고, G/C 양이 35% 이상이며, 보다 바람직하게는 길이는 10-17 머이고, G/C 양이 40% 이상이다. 상기 다수의 프라이머 중 증폭 단계에서 이용되는 양 말단의 프라이머는 제한효소 절단 자리로 이루어진 클로닝 부위를 갖는 것이 바람직하다.

<55> 상술한 연결반응-부재 PCR 방법을 플리오바이러스 벡터내에 삽입되는 반복된 항원성 결정 부위를 코딩하는 DNA 서열의 제조 및 증폭에 적용하면, 우선 수형과 프라이머의 역할을 하는 다수의 DNA 단편을 제작하여야 하는데 이 프라이머는 다음과 같은 특징을 갖는다: (a) 다수의 프라이머는 최종적으로 제조하고자 하는 열

멀티머성 항원 결정 부위를 코딩하는 DNA 염기 서열을 적합한 크기로 분할하여 디자인된 것이고; (b) 상기 다수의 프라이머의 5'-및/또는 3'-말단은 다른 프라이머의 말단 서열에 대하여 상보적인 서열을 포함하며; (c) 상기 상보적인 서열은 8-20 머 길이와 35% 이상의 G/C 양을 갖고; 그리고 (d) 증폭 단계에서 이용되는 양 말단의 프라이머는 제한효소 절단자리로 이루어진 클로닝 부위를 갖는다. 이어, 합성된 다수의 프라이머를 혼합하되, 증폭 단계에서 이용되는 양 말단의 프라이머:나머지 프라이머의 농도비를 1:3-1:8로 한다. 그런 다음, 다음과 같은 연쇄적인 PCR 반응을 포함하는 원하는 크기의 멀티머성 항원 결정부위를 코딩하는 외래 DNA 서열의 전장을 제조하는 숙성 단계를 실시한다: 92°C-96°C에서 20-40초 동안의 변성, 25°C-40°C에서 20-40초 동안의 어닐링 및 68°C-75°C에서 30초-55초 동안의 합성 반응. 그리고 나서, 다음과 같은 연쇄적인 PCR 반응을 직접 링크시킴으로써 상기 제조된 외래 DNA 서열의 전장을 증폭하는 단계를 실시한다: 92°C-96°C에서 20-40초 동안 변성, 68°C-75°C에서 40초-1분 10초 동안의 어닐링 및 합성 반응.

<56> 결국, 본 발명의 플리오바이러스 벡터를 이용하여 개발한 생백신의 유전적 안정성을 개선하는 방법 및 연결반응-무재 PCR 방법을 이용하면 다양한 멀티머성의 항원결정 부위를 수형 DNA가 없이도 손쉽게 합성하여 벡터에 클로닝 할 수 있을 뿐 아니라 도입된 멀티머의 유전적 안정성도 크게 개선된 재조합 생백신을 용이하게 제작할 수 있다.

- <57> 본 발명의 다른 양태는 상기한 외래 DNA 서열의 유전적 안정성을 개선하는 방법에 의해 제조된 단일쇄 RNA 바이러스 재조합 벡터 및 폴리오바이러스 재조합 벡터를 제공한다.
- <58> 본 발명의 벡터에 적용되는 여러 가지 바람직한 구현예에 대한 사항은 상술한 본 발명의 유전적 안정성을 개선하는 방법에 적용되는 사항이 적용된다.
- <59> 예를 들어, 본 발명의 벡터에 삽입되는 외래 DNA 서열은 그 유전적 안정성을 개선하기 위하여 상기 외래 DNA 염기 서열의 G/C 양의 분포를 전체 외래 DNA 서열에 걸쳐 균일하게 분포되도록 변이된 것이고, 상기 단일쇄 RNA 바이러스 재조합 벡터는 폴리오바이러스 벡터, 황열 바이러스 벡터, 베네수엘라 에킨 엔세팔리티스 바이러스 벡터, 루벨라 바이러스 벡터 및 콕사키 바이러스 벡터로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것이다.
- <60> 또한, 상기 본 발명의 재조합 벡터에 있어서, 상기 변이에 의해 G/C 양이 증가된 외래 DNA 염기 서열의 G/C 양은 전체 외래 DNA 염기 서열에 대하여 40% 이상인 것이 바람직하고, 상기 외래 DNA 염기 서열의 길이는 450 bp 이하인 것이 특히 바람직하다.
- <61> 본 발명의 폴리오바이러스 재조합 벡터는 사빈 1형, 사빈 2형 및 사빈 3형으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 사빈형 바이러스로부터 유래된 것이 바람직하다.
- <62> 또한, 본 발명의 폴리오바이러스 재조합 벡터에서 상기 외래 DNA 염기 서열은 폴리오바이러스 재조합 벡터의 5'-말단에 인위적으로 형성된 1종 이상의 제한효소 절단부위를 포함하는 클로닝 부위에 삽입되는 것이 바람직하고, 상기 폴리오바이러스의 클로닝 부위의 3' 쪽에는 폴리오바이러스의 지놈이 인코딩하는 3C-프로테아제가 인식할 수 있는 프로테아제 절단부위가 추가적으로 삽입되어 있는 것이 바람직하다.

- <63> 본 발명의 가장 바람직한 사빈 1형 재조합 벡터는 첨부 도 1의 유전자 지도에 도시된 벡터의 다중 클로닝 부위에, 변이 처리된 외래 DNA 서열이 삽입된 것이다.
- <64> 상술한 바와 같이, 본 발명의 벡터에 적용되는 여러 가지 바람직한 구현예에 대한 사항은 상술한 본 발명의 유전적 안정성을 개선하는 방법에 적용되는 사항이 적용되므로 편의적으로 기재를 생략하며, 당업자라면 누구라도 상술한 본 발명의 유전적 안정성을 개선하는 방법에 적용되는 사항으로부터 본 발명의 벡터를 인식할 수 있다.
- <65> 본 발명은 상기한 방법에 의해 제조된 폴리오바이러스 재조합 벡터로 형질감염된 숙주 세포, 예컨대 HeLa 세포로부터 분리한 키메라 폴리오바이러스를 포함하는 약제학적 백신 조성물을 제공한다. 상기 키메라 폴리오바이러스에는 바람직하게는 상기한 병원성 바이러스의 항원성 결정 부위가 융합된다. 본 발명의 약제학적 조성물은 바람직하게는 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제를 추가적으로 포함하고, 백신 제조에 통상적으로 이용되는 어떠한 담체 또는 희석제도 이용할 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따라 제조된 키메라 폴리오바이러스는 $MgCl_2$, 수크로오스 및 인산염 용액 내에서 안정화될 수 있다. 본 발명의 백신 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있고, 가장 바람직하게는 경구로 투여될 수 있다. 본 발명의 백신 조성물은 사빈형 백신에 대하여 공지된 투여량, 즉 10^6 TCID₅₀ 이하로 투여될 수 있다.
- <66> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본

발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

<67> 실시예 I : 외부 DNA 서열의 클로닝 및 재조합 폴리오바이러스의 제조

<68> I -1: 삽입 DNA의 합성

<69> 하기 표 1에 기재된 항원 단백질을 코딩하는 DNA 단편을 합성하였다. 항원으로 이용된 모노머로서의 SIV(Simian Immunodeficiency Virus) gag-100(참조: 서열번호 1), SIV gag-114(참조: 서열번호 2), SIV p27-167(참조: 서열번호 3), SIV p27-150(참조: 서열번호 4), SIV env-108(참조: 서열번호 5), HIV-1 env-98(참조: 서열번호 6), HIV-1 env-83(참조: 서열번호 7), HIV-1 env-71(참조: 서열번호 8), HIV-1 env-98/M(참조: 서열번호 9), PV(poliovirus) 2-127(참조: 서열번호 10), PV 2-118(참조: 서열번호 11), PV 3-110(참조: 서열번호 12), HCV core-160(참조: 서열번호 13) 및 HCV core-100(참조: 서열번호 14); 헤테로 다이머로서의 PV 2.3-131(참조: 서열번호 15), PV 2.3-112(참조: 서열번호 16) 및 HBV C.S(참조: 서열번호 17); 연쇄 멀티머로서의 HIV-1 mV3(참조: 서열번호 18) 및 HIV-1 PND8(참조: 서열번호 19); 디자인된 멀티머로서의 OPV(Oral poliovirus)-150(참조: 서열번호 20), OPV-137(참조: 서열번호 21) 및 OPV-132(참조: 서열번호 22)의 합성된 DNA의 염기 서열은 첨부한 서열목록과 같다.

<70> 상기 항원들은 폴리오바이러스 수 및 다른 병원성 바이러스의 구조 단백질에서 주요한 항원 결정 부위이다. 또한, 대부분의 항원은 다수의 작은 에피토프들이 연속적으로 놓이도록 제작되었고, 이에 의해 면역반응에 상승효과가 유발된다. 더욱이, 모든 삽입 DNA는 500 bp 이하로 제한하였고, 이는 야생형 및 다른 사빈 폴리오바이러스 수의 경우 계대시 안정한 삽입 DNA의 크기의 상한선이 450-600 bp이고 상기 상한선을 초과하는 경우에는 유전적 안정성이 급격하게 감소하기 때문이다. 상기 연쇄 멀티머의 경우에는 동일한 DNA 서열의 반복을 피하기 위해 유전자 코드의 축퇴성을 이용하여 아미노산 서열은 동일하지만 DNA는 다른 서열을 갖도록 디자인하였다. 한편, 상기 디자인된 멀티머의 경우에는 A/T 풍부 부위 및 반복된 DNA 서열을 갖지 않도록 하기 실시예 VI에 기재된 바와 같이 연결반응-부재 PCR 방법으로 합성하였다.

<71> I -2: 삽입 DNA의 증폭

<72> 상기 과정에서 합성된 DNA 산물을 PCR로 증폭하였다. PCR 때 사용한 프라이머는 RPS-Vax 시스템의 클로닝 효소인 *Sst*II와 *Eag*I 절단 서열을 포함하도록 제작하였다. PCR은 퍼킨 엘머사 9700 기기를 사용하였으며, 증합효소는 베링거만하임사로부터 구입한 PWO DNA 증합효소(Cat#:1644947)를 사용하였고, 대체적으로 어닐링은 47℃에서 30초, 연장반응은 72℃에서 1분, 변성은 94℃에서 30초간으로 하여 총 25 사이클을 수행하였다.

<73> I -3: 재조합 벡터의 제조 및 클로닝

<74> 우선, 사빈 1형 폴리오바이러스의 cDNA는 Jung, H. 및 Y.-S. Bae, *J. Biochem. Mol. Biol.* 31:432-443(1998)에 개시된 방법에 따라 제작된 RPS-Vax 벡터 (기탁번호: KCTC 0365BP, 기탁명: pTZ-PVS-3m)에 있는 것을 사용하였다. 상기 cDNA는 3C^{pro} (AXXQ/G)에 대한 인위적 절단 부위 및 다중 클로닝 부위(*Sst*II, *Hpa*I 및 *Eag*I 절단 부위)를 포함하는 30 bp의 플리링커를 갖는다(참조: 도 1). 상기 1-2에서 증폭된 항원의 DNA를 상기 다중 클로닝 부위의 *Sst*II (NEB, Cat#:157S) 및 *Eag*I (NEB, Cat#:505S) 절단 부위에 삽입시킨 다음, 대장균 JM109 숙주 균주(STRATAGENE, Cat#:200235)에서 증폭하였다.

<75> 상기한 방법에 의해 제작된 재조합 사빈 1형 벡터 중 OPV-150이 삽입된 벡터를 RPS/OPV-150라 명명하고, 이를 국제기탁기관인 생명공학연구소 유전자은행에 2001년 2월 1일자로 기탁하고, 기탁번호 KCTC 0940BP를 부여받았다.

<76> 실시예 II: 인 비트로 전사 및 형질감염

<77> II- 1: 인 비트로 전사

<78> 상기 실시예 I에서 제작한 벡터를 Bae 농(*Nucleic Acids Res.* 21:2713-2718(1993))의 방법에 따라 *Sa*/I으로 절단하여 선형의 플라스미드로 만든 다음, 페놀/클로로포름 추출 과정을 3번 반복 후 에탄올 침전하여 RNase 오염 가능성을 최소화하였다. 반응용액(40 mM Tris-Cl; pH 8.0, 8 mM MgCl₂, 2 mM 스퍼미딘, 25 mM NaCl, 5 mM 디티오프레이놀, 1 unit/ μ l RNasin, 2 mM NTP)에 0.1 μ g/ μ l의 상기 선형 DNA

및 5 유닛/ μl 의 T7 RNA 중합효소를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 이어, 반응 결과물을 페놀/클로로포름으로 여러 차례 추출한 다음 에탄올로 침전시켜 최종 재조합 바이러스 RNA 전사체를 수득하였다.

<79> II-2: 형질감염

<80> DEAE-덱스트란 방법(Van der Welf et al., *PNAS* 83:2330-2334(1986))에 따라 HeLa 세포(ATCC, Cat:CCL-2)에 상기 재조합 RNA 전사체를 형질감염시켰다. 우선, 1-2 μg 의 상기 재조합 RNA 0.2 ml을 농일 부피의 DEAE-덱스트란(1 mg/ml in HEPES-완충 염수)과 혼합한 다음, 이 혼합액을 70% 정도 성장한 단층의 HeLa 세포에 도포하고 상온에서 15분간 방치하였다. 이어, 세포를 PBS로 2회 세척하고 10% 우태아혈청(FCS)이 함유된 DMEM으로 2-3일 동안 배양한 다음, Jung, H. 및 Y.-S. Bae, *J. Biochem. Mol. Biol.* 31:432-443(1998)에 개시된 방법에 따라 세포 병변 효과를 확인하였고, 상기한 모든 재조합체는 복제 능력을 갖는 자손 바이러스를 생산함을 알 수 있었다. 또한, 재조합체의 단일-과정 성장 특성 및 RNA 합성의 속도론적 특성은 사빈 1형 폴리오바이러스와 유사하였고, 이와 같은 사실은 삽입된 외래 유전자가 올바르게 발현되고 외래 유전자의 존재가 바이러스의 기본적인 기능을 방해하지 않음을 나타낸다.

<81> 도 2는 HIV의 mV3 또는 PND 부위가 융합된 본 발명의 폴리오바이러스 재조합 벡터 및 키메라 폴리오바이러스의 제조과정을 개략적으로 나타낸 것이다.

<82> 한편, 키메릭 폴리오바이러스 증식 시 발현되는 외래 항원은 웨스턴 블롯팅방법으로 확인하였다. 대부분의 경우, 웨스턴 블롯팅에서는 올바르게 가공된 폴리펩타이드의 단일의 명확한 밴드가 관찰되었으나, 보다 큰 분자량을 갖는 마이너 밴드도 관찰되었다. 상기 마이너 밴드는 부분적으로 가공된 융합 단백질에 해당하는 것으로 주측되며, 이는 3C^{pro} 프로테아제에 대한 인위적인 절단 부위가 효소 반응에 대한 최적의 환경을 제공하지 못한다는 것을 나타낸다.

<83> 실시예 III: RT-PCR에 의한 유전적 안정성 시험

<84> 상기 실시예에서 생산된 키메릭 폴리오바이러스를 HeLa 세포에 형질감염시켜 37℃에서 18시간 동안 항온 배양하였고, 각각의 계대마다 MOI = 10으로 형질감염시켰으며, 또한 각각의 계대마다 폴리오바이러스를 수확하여 페놀-클로로포름 추출 및 에탄올 침전 방법으로 총 RNA를 얻었다. 그런 다음, 10 µg의 세포질 RNA를 1 µg의 프라이머 (GGTAGAACCACCATACGC 797-814/안티센스)와 혼합한 후, 70℃에서 10분 동안 변성시켰다. 그리고 나서, 즉시 얼음에 옮기고 여기에 역전사 효소 반응용액(50 mM Tris HCl, pH 8.3, 65 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM dNTP 혼합물, 20 유닛 RNAsin)과 200 유닛의 MMLV(Moloney Murine Leukemia virus) 역전사 효소(Promega)를 첨가한 후 42℃에서 60분 동안 반응시켜 cDNA를 제조하였다. 반응이 완전히 끝난 후 100℃에서 3분 동안 항온 처리하여 효소를 불활화 시켰다. 이어, 상기 합성된 cDNA를 수형으로 하고,

사빈 1형 프라이머(CATTGAGTGTGTTTACTC: 680-697/ 센스 및 GGTAGAACCACCATACGC: 797-814/ 안티센스)를 사용하여 삽입된 서열이 포함된 폴리오바이러스 지놈 부위를 PCR 증폭하였다. PCR은 퍼킨 엘머사 9700 기기를 사용하였으며, Taq 중합효소를 이용하여 변성은 94℃에서 30초, 어닐링은 45℃에서 30초, 연장반응은 72℃에서 45초간으로 하여 총 25 사이클을 행하였다. 이어, PCR 산물을 아가로스 겔에서 전기영동하여 밴드 패턴을 관찰하였다.

<85> 본 실시예에서는 12 회까지 지속적으로 계대하면서 삽입된 외래 유전자의 유전적 안정성을 확인하였다. 하기의 표 1은 각각의 외래 항원에 대한 실험 결과로서 유전적 안정성을 나타내는 계대 횟수로 나타내었다. 도 3a는 PV 2-118, 도 3b는 PV 2.3-131 및 도 3c는 HIV-1 mV3가 각각 융합된 RPS-Vax에 대한 RT-PCR 결과이다. 도 3에서 M 레인은 100 bp DNA 사이즈 마커, S 레인은 사빈 1형, R 레인은 재조합 RPS-Vax, 그리고 C 레인은 삽입물을 포함하는 재조합 RPS-Vax의 RT-PCR 산물을 각 레인에 로딩한 결과이다.

<86> 도 3a에서 볼 수 있듯이, RPS-Vax에 융합된 PV 2-118은 12 회 계대 동안 삽입된 DNA가 그대로 유지되었다. 또한 하기의 표 1에서 확인할 수 있듯이, 재조합체 22종 중 14개가 이러한 완전한 안정성을 나타내었다. 한편, 도 3b에서 볼 수 있듯이, RPS-Vax에 융합된 PV 2.3-131은 폴리오바이러스 야생형 중 2형인 랜싱과 3형인 레온의 VP1 단백질 중 수항원 결정부위를 포함하는 헤테로 다이머 재조합 RPS-Vax로서 12 계대 동안 전장의 삽입 서열이 계속 관찰되었으나, 8회 계대 이후부터는 유전적 안정성이 점진적으로 감소되어 나중에는 작은 분자량의 마이너 밴드가 보다 명확하게 나타났다. 도 3c에서 볼 수 있듯이, RPS-Vax에 융합된 HIV-1 mV3은 HIV-1의 표면단백질인 gp120의 수항원 결정부위인 V3 부위를 다수 포함하는 멀티머로서 유전적 안정성이 낮아 8회 계대 이후에는

전장의 삽입 서열이 전혀 관찰되지 않았고, 하기의 표 1에서 확인할 수 있듯이 HIV-1 mV3와 같이 반복된 염기 서열을 갖는 HIV-1 PND8도 비슷한 양상의 낮은 유전적 안정성을 나타내었다.

<87> 하기의 표 1 및 도 3에서 확인할 수 있듯이, 가장 우수한 유전적 안정성을 나타내는 삽입 서열(예: PV 2-118)은 그 길이가 약 450 bp 이하이고, G/C 함량이 40% 이상으로 고른 G/C 분포를 갖는 경우이다. 이러한 서열은 압축된 RNA 형태를 갖을 것이고, 견고한 바이러스의 캡시드내에 용이하게 포막될 것으로 추측된다.

<88> 한편, G/C 함량이 30% 미만인 경우에는 삽입 서열의 길이와는 무관하게 유전적 안정성이 크게 감소되었다(예: HIV-1 env-98 및 HIV env-71). 상기 서열은 비록 작은 크기의 RNA를 형성하지만 느슨하게 패키징되어 캡시드의 한정된 공간내에 수용되기가 어려울 것으로 추측된다. HCV core-160인 경우에는 G/C 함량이 62.3%이지만 삽입 서열이 480 bp이므로, 캡시드내에 포함될 수 있는 한계치를 넘기 때문에 유전적 안정성이 크게 저하된다.

<89> 상술한 G/C 함량과 유전적 안정성과의 관계는 G/C 염기서열이 전체 서열에 균일하게 분포된 경우에 적용되는 것이다. 만일, G/C 함량이 서열의 부위에 따라 상이한 경우에는 캡시드내로 포막되는 RNA의 공간적 형태는 전체 서열에 있어서의 G/C 함량 보다 국부적인 G/C 함량에 의해 결정된다. 더욱이, 이웃하는 염기 사이의 단-범위(short-range) 상호작용이 RNA의 2차 구조를 형성하는 데 중요한 요인이 되고, 이는 3차

구조 형성의 틀을 제공하므로 국부내의 서열 특성이 매우 중요하다. 따라서, RNA의 공간적 형태를 정확하게 파악하기 위해서는 특이한 국부 서열의 발생 및 분포를 반드시 고려하여야 한다

<90> HIV-1 env-98, HIV-1 env-83, HIV-1 env-71 및 HIV-1 env-98/M의 유전적 안정성을 확인한 하기의 표 1 그리고 도 4a, 도 4b, 도 4c 및 도 5의 결과는 상술한 내용을 다시 한번 확인시켜 주었다. 도 5에서 M 레인은 100 bp DNA 사이즈 마커, S 레인은 사빈 1 형, R 레인은 재조합 RPS-Vax, 그리고 C 레인은 삽입불을 포함하는 재조합 RPS-Vax의 RT-PCR 산물을 각각 로딩한 웰이다.

<91> 도 5의 아래 패널에서 볼 수 있듯이, 패시지에 따른 RT-PCR 수행결과 HIV-1 env-98 및 HIV-1 env-71은 패시지가 증가되면 절단된 단편을 나타내었고, 상기 절단 단편의 염기 서열을 다이디옥시 방법으로 시퀀싱하여(Sanger, F. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74:5463 (1977)) 결실이 서열 특이적으로 발생하는 지를 확인하였다. HIV-1 env-98은 서열 165-261에서 HIV-1 env-71은 서열 142-264에서 결실이 발생함을 확인하였고, 이로부터 서열 165-261이 공통된 결실 부위임을 알 수 있었다.

<92> 한편, HIV-1 env-98 및 HIV-1 env-71의 3'-말단에는 A/T 풍부 부위가 있으나, 유전적 안정성을 나타내는 HIV env-83에는 A/T 풍부 부위인 3'-말단 부위가 부재하기 때문에(참조: 도 4a,b), A/T 풍부 부위가 유전적 불안정성을 초래하는 것으로 추측되어 이를 다음과 같이 확인하였다.

<93> 우선, HIV-1 env-98의 3'-말단 A/T 풍부 부위(서열 250-294)의 13개의 위치에 인위적으로 침묵 변이(silent mutation)를 유발시켜 G/C 함량을 증가시켰다 (참조: 도 4b). 동일 아미노산을 코딩하는 서열의 범위 안에서 13개의 A와 T를 G 또는 C로 교체한 프라

이머 (AGTTCAGGAACAAGACCATCGCCCGCCGTATTA: 1058-1080/센스 및
TCTCCCTAAGCTTGATCACTATCTGTTGTAAAGTG: 1057-1023/안티센스)를 제작하여 HIV-1 env-98/M
에 대한 PCR을 수행하였다. PCR은 퍼킨 엘머사 9700 기기를 사용하였으며, 증합효소는
베링거만하임사로부터 구입한 PWO DNA 증합효소를 사용하였고, 변성은 94℃에서 30초,
어닐링은 43℃에서 30초, 연장반응은 72℃에서 2분간으로 하여 총 25 사이클을 행하였다
. 합성된 DNA는 실시예 1에서와 동일 방법으로 RPS-Vax에 재조합한 후 인 비트로 전사
와 형질감염을 통하여 복제 능력을 갖는 자손 바이러스를 생산하였다. 도 4b에서는 상
기 변이에 의해 A/T 풍부 부위의 G/C가 46.7%로 변화되었음을 나타내고, 도 4c에서는 상
기 변이 유발에 의해 삽입 서열의 G/C가 균일하게 분포됨을 보여준다.

<94> 이어, 변이가 유발된 HIV-1 env-98/M에 대하여 RT-PCR로 유전적 안정성을 상술한
바와 같이 확인하였고, 그 결과 유전적 안정성이 크게 증가됨을 볼 수 있었다(참조: 도
5). 상기한 결과는 국부적인 A/T 풍부 서열이 전체적인 RNA 구조의 안정성을 크게 저
하시키고, 이웃하는 부위의 위치-특이적 결실을 초래함을 보여준다. 또한, 상기 결과
는 전체적인 G/C 함량 및 분포의 균일성을 조절하면 유전적 안정성을 조작할 수 있음을
나타내는 것이다.

<95> 【 표 1 】

삽입 DNA 서열의 종류	삽입 DNA 서열의 길이 (bp)	삽입 DNA 서열의 G/C 양 ^a (%)	삽입 DNA 서열의 ΔG^b (kcal/mole)	키메릭 폴리오마이러스의 유전적 안정성 (패시지수)
SIV gag-100	300	54.3	-160.6	>12
SIV gag-114	342	44.7	-97.0	>12
SIV p27-167	501	43.7	-92.6	5
SIV p27-150	450	43.8	-102.3	>12
SIV env-108	324	35.4	-83.8	6
HIV-1 env-98	294	30.6	-56.2	2
HIV-1 env-83	249	32.5	-48.9	>12
HIV-1 env-71	213	30.0	-36.5	4
HIV-1 env-98/M	294	34.7	-65.0	>12
PV 2-127	381	47.5	-113.1	>12
PV 2-118	354	44.6	-103.9	>12
PV 3-110	330	50.0	-110.4	>12
HCV core-160	480	62.3	-196.3	3
HCV core-100	300	60.3	-172.5	>12
PV 2.3-131	393	48.0	-106.2	7
PV 2.3-112	336	43.8	-110.2	>12
HBV C.S	306	46.4	-105.2	>12
HIV-1 mV3	360	33.9	-58.1	3
HIV-1 PND8	240	43.3	-76.8	9
OPV-150	450	58.4	-138.9	>12
OPV-137	411	58.4	-132.9	>12
OPV-132	396	58.8	-147.6	>12

^a 삽입 DNA 서열의 G/C 양은 DNASIS 프로그램으로 계산된 것이다(윈도우 크기를 9로 함)

^b ΔG 는 삽입 DNA 서열의 RNA 전사체가 2차구조를 형성하는 자유에너지에 해당하는 것으로서 DNASIS 프로그램으로 계산된 것이다(최대 벌칙 및 내부 루프 크기는 30으로 함)

<96> 실시예 IV: 웨스턴 블롯에 의한 유전적 안정성 시험

<97> HeLa 세포를 사빈 1형 및 각각의 재조합 폴리오마이러스(MOI = 10)로 형질감염시키고, 37°C에서 24시간 동안 항온 배양한 다음 세포를 수확하였다. 이어, 세포를 적당량의 PBS로 재현탁한 다음, 농일 부피의 2x 시료 완충액(62.5 mM Tris-Cl, pH 6.8, 10% 글

리세볼, 2% SDS, 1% β -머캅토에탄올, 브로모페놀 블루 및 크실렌 시아놀 0.01 mg/ml)을 첨가하여 100℃에서 10분 동안 끓이고 핵은 원심분리로 제거하였다. 이렇게 얻은 총 분해액에 대하여 12% SDS-PAGE를 실시하였다. 그런 다음, 전기 영동에 의해 분리된 단백질 밴드를 반-건조 겔 전이장치(Bio-Rad)를 사용하여 니트로셀룰로오스막에 전이시켰다. 그리고 나서, 상기 막을 녹일 국립 영장류센터로부터 분양받은 SIV_{mac}239 균수에 감염된 원숭이의 항혈청으로 각각 1차 반응시키고, 여기에 알칼린 포스파타아제(AP)가 접합된 항-IgG-AP(Sigma)로 2차 반응시킨 다음, 막을 NBT/BCIP(Sigma)가 첨가된 알칼린 포스파타아제 반응용액에 옮겨 발색 밴드를 관찰하였다. 도 6a 및 도 6b는 SIV p27-150 및 SIV p27-167의 유전적 안정성을 확인한 RT-PCR 및 단백질 안정성을 확인한 웨스턴 블롯팅 결과를 나타내는 것이다. 도 6a에서 볼 수 있듯이, SIV p27-150은 유전적 안정성을 나타내었으나, SIV p27-167은 6회 계대부터 유전적 안정성이 크게 감소됨을 알 수 있다. 또한, 도 6b에서 볼 수 있듯이, SIV p27-167의 경우에는 단백질의 발현도 유전적 안정성의 감소와 함께 크게 감소됨을 알 수 있다.

<98> 실시예 V: 접종된 Tg-PVR 마우스로부터 바이러스의 분리

<99> 우선, 본 발명의 플리오바이러스 사빈 1형에 의한 Tg-PVR 마우스의 접종조건을 확립하였다. 접종부위에 따라 뇌(intracerebral route), 근육 및 정맥 주사에서 효과가 확인되었고, 실험을 하기에 적절한 마우스의 나이(4주령), 적절한 바이러스의 접종량(1×10^7 PFU) 및 접종 후의 면역유도 확인에 필요한 최소한의 기간(4주 이상)과 증식된 바이러스의 분리가 가능한 기간(5일 이내)을 조사하여 실험 조건을 표준화하였다. 이어, SIV p27-150 또는 SIV p27-167가 융합된 RPS-Vax 벡터

에 의해 상술한 방법으로 생산한 키메릭 폴리오바이러스懸液을 상기 표준화된 조건에 따라 뇌(intracerebral route)에 접종하였다. 이 때 26 게이지 니들에 30 게이지 니들을 결합시킨 특정 수사기를 사용하여 접종시의 충격을 완화시킴으로 접종시 사망요인을 최대한 제거하였다. 접종 후 격리 사육하면서 일주일 동안 1일 간격으로 비장을 분리한 후 이를 분쇄하여 상능액을 취하여 HeLa 세포에 감염시키고, 증식된 바이러스를 회수하여 상기 실시예 III과 동일한 방법으로 RT-PCR을 실시한 다음, 생성물을 아가로스 겔에서 전기영동하여 밴드 패턴을 관찰하였다. 도 7에서 확인할 수 있듯이, SIV p27-150은 4일 동안 유전적 안정성을 나타내었으나, SIV p27-167은 2일부터 유전적 안정성이 크게 감소되었다. 이러한 실험 결과는 HeLa 세포를 이용한 도 6의 결과와 일치하는 것이다.

<100> 본 실시예의 결과는 본 발명의 방법에 따라 제작된 재조합 바이러스의 유전적 안정성이 엑스 B/보에서 뿐만 아니라 임상적으로 의미가 있는 인 B/보에서도 유지됨을 나타낸다.

<101> 실시예 VI: 인위적으로 제작된 에피토프 멀티머의 유전적 안정성 확인

<102> 복적 백신의 항원성을 향상시키기 위하여 멀티머성 에피토프를 제작하는 것이 일반적이다. 그러나, 반복되는 염기 서열이 외래 삽입 서열에 포함되어 있는 경우에는 결실이 일반적으로 초래된다(예: HIV-1 mV3; 도 3c).

<103> 한편, 450 bp 이하의 삽입 서열의 유전적 안정성은 상기 실시예에서 확인된 바와 같이 G/C 함량을 40% 이상으로 조절하고 G/C의 분포를 균일하게 함으로써 증

가시킬 수 있다. 따라서, 반복된 염기 서열을 갖는 삽입 서열의 경우에는, 본 발명의 시스템의 기본적인 제작 원칙에 따라 코돈을 적합하게 조절하는 것이 필요하다. 적합한 코돈 사용의 기준은 다음과 같다: 첫째, 플리오바이러스의 숙주인 사람에 있어서 덜 이용되는 코돈의 사용을 피한다. 둘째, 선호성이 큰 코돈 가운데에 G/C 양이 큰 코돈을 이용한다. 셋째, 최종적으로 전체 염기 서열에서 A/T 풍부 서열 능과 같은 국부적인 반복서열을 피한다.

<104> VI-1. 연결반응-부재(Ligation-free) PCR에 의한 DNA의 고속 합성

<105> 상술한 기준에 따라 OPV-150, OPV-137 및 OPV-132를 연결반응-부재 PCR로 제작하였다. OPV-150을 예로 하면, 첨부 도 8에서 볼 수 있듯이 랜싱 플리오바이러스의 중화(neutralizing) 에피토프 및 레온 플리오바이러스의 중화 에피토프가 반복된 항원성 결정 부위를 코딩하는 DNA 서열을 상술한 기준에 따라 반복되는 염기 서열을 회피하도록 DNA 서열을 디자인하였다. 이어, 디자인된 DNA 서열을 본 발명의 연결반응-부재 PCR 방법으로 제작하기 위하여, 클로닝 부위(*Sst*II/1 및 *Eag*I/2 절단 부위)를 포함하며 프라이머와 수형의 역할을 동시에 하는 DNA 단편 8개(1,3,5,7/센스 및 2,4,6,8/안티센스)를 바이오닉스사(대한민국)에 의뢰하여 합성 및 PAGE 정제하였다(참조: 도 9). 상기 각각의 프라이머의 5' 또는 3'-말단의 15 머(mer)는 상보적인 프라이머와 어닐링될 수 있도록 제작되었다. 8개의 프라이머 중 클로닝에 필요한 제한효소 부위를 포함하며 실제 원하는 크기의 연쇄-멀티머의 증폭에 사용되는 양 말단의 프라이머의 최종농도는 200 ng로(반응량을 50 μ l로 했

을 때), 숙성에만 사용되는 나머지 10개의 프라이머의 최종 농도는 50 ng로 1:4의 비율로 혼합한 다음 94℃에서 30초간 변성하고, 35-40℃에서 30초간 어닐링한 후 72℃에서 1분간 합성반응을 수행하는 과정을 5-10사이클 반복하고 이어, 이를 94℃에서 30초 동안 변성 반응, 어닐링 및 연장반응은 72℃에서 1분으로 하여 총 20-25 사이클을 수행하여 원하는 크기의 연쇄-멀티머를 증폭하였다. 이때 PCR은 퍼킨 엘머사 9700 기기를 사용하였으며 증합효소는 베링거만하임사로부터 구입한 PWO DNA 증합효소(Cat#:1644947)를 사용하였다. 첨부 도 10은 상기한 연결반응-부재 PCR 방법으로 제조된 산물을 보여준다. 도 10에서 M 레인은 100 bp 사이즈 마커, 1번 레인은 상기한 프라이머 1, 2, 3 및 4를 이용한 경우, 2번 레인은 프라이머 1, 2, 3, 4, 5 및 6을 이용한 경우, 그리고 3번 레인은 프라이머 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 및 8을 이용하여 제조된 산물을 각각 로딩한 것이다. 도 10에서 확인할 수 있듯이, OPV-150을 코딩하는 DNA 서열이 본 발명의 연결반응-부재 PCR 방법에 의해 제조되었다.

<106> VI-2. 유전적 안정성 확인

<107> 제작된 OPV-150, OPV-137 및 OPV-132에 대한 유전적 안정성을 조사한 결과, 상기 표 1에서와 같이 12회 계대하는 동안 안정성이 유지되었다. 한편, 도 11a는 OPV-150의 유전적 안정성을 보여주는 RT-PCR 결과에 대한 겔 사진이고, 도 11b는 단백질 수준에서 안정성을 보여주는 웨스턴 블롯팅 결과에 대한 사진이다. 사용된 1차 반응 항체는 본 실험실에서 제작한 것으로 BSA 접합 항-PV2 및 PV3 에피토프 펩타이드를 BALB/c 생쥐에

면역하여 얻은 것이다. 도 11a 및 도 11b에서 볼 수 있듯이, OPV-150은 유전적 안정성과 더불어 단백질 수준에서의 안정성도 확인할 수 있었다.

【 발명의 효과 】

<108> 본 발명은 단일쇄 RNA 바이러스 재조합 벡터내의 삽입 외래 DNA의 유전적 안정성을 증가시키는 방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 플리오바이러스 재조합 벡터내의 삽입 외래 DNA의 유전적 안정성을 증가시키는 방법을 제공한다. 한편, 본 발명은 연결반응-부재 PCR 방법을 이용한 DNA의 제조방법을 제공한다. 본 발명의 방법은 종래의 플리오 바이러스를 재조합 벡터로 사용하는 것 보다 다양한 항원결정부위를 포함할 수 있는 벡터를 제공하고 외래 유전자의 유전적 안정성을 크게 향상 할 수 있는 방법을 제공함으로써 재조합 생백신으로서의 플리오바이러스 벡터의 유용성을 크게 향상시킨다.

【 특허청구범위 】**【 청구항 1 】**

단일쇄 RNA 바이러스 재조합 벡터내의 삽입되는 외래 DNA 염기 서열의 G/C 양의 분포를 전체 외래 DNA 서열에 걸쳐 균일하게 분포되도록 변이시키는 단계를 포함하는 단일쇄 RNA 바이러스 재조합 벡터내의 삽입 서열의 유전적 안정성을 개선하는 방법.

【 청구항 2 】

제 1 항에 있어서, 상기 단일쇄 RNA 바이러스 재조합 벡터는 폴리오바이러스 재조합 벡터, 황열 바이러스 벡터, 베네수엘라 에퀀 엔세팔리티스 바이러스 벡터, 루벨라 바이러스 벡터 및 콕사키 바이러스 벡터로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 단일쇄 RNA 바이러스 재조합 벡터내의 삽입 서열의 유전적 안정성을 개선하는 방법.

【 청구항 3 】

폴리오바이러스 재조합 벡터에 삽입되는 외래 DNA 염기 서열의 G/C 양의 분포를 전체 외래 DNA 서열에 걸쳐 균일하게 분포되도록 변이시키는 단계를 포함하는 폴리오바이러스 재조합 벡터내의 삽입 서열의 유전적 안정성을 개선하는 방법.

【 청구항 4 】

제 1 항 또는 제 3 항에 있어서, 상기 외래 DNA 염기 서열의 G/C 양을 균일하게 분포되도록 변이시키는 것은 상기 외래 DNA 염기 서열의 G/C 양을 증가시켜 실시됨을 특징으로 하는 방법.

【 청구항 5 】

제 4 항에 있어서, 상기 변이에 의해 G/C 양이 증가된 외래 DNA 염기 서열의 G/C 양은 전체 외래 DNA 염기 서열에 대하여 40% 이상인 것을 특징으로 하는 방법.

【 청구항 6 】

제 1 항 또는 제 3 항에 있어서, 상기 외래 DNA 염기 서열의 G/C 양을 균일하게 분포되도록 변이시키는 것은 상기 외래 DNA 염기 서열의 국부적인 A/T 풍부 서열의 G/C 양을 증가시켜 실시됨을 특징으로 하는 방법.

【 청구항 7 】

제 1 항 또는 제 3 항에 있어서, 상기 변이는 침묵 변이를 이용하여 실시됨을 특징으로 하는 방법.

【 청구항 8 】

제 1 항 또는 제 3 항에 있어서, 상기 외래 DNA 염기 서열의 길이는 450 bp 이하인 것을 특징으로 하는 방법.

【 청구항 9 】

제 2 항 또는 제 3 항에 있어서, 상기 폴리오바이러스 재조합 벡터는 폴리오바이러스 1형, 폴리오바이러스 2형 및 폴리오바이러스 3형으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것임을 특징으로 하는 방법.

【 청구항 10 】

제 2 항 또는 제 3 항에 있어서, 상기 폴리오바이러스 재조합 벡터는 사빈 1형, 사빈 2형 및 사빈 3형으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것임을 특징으로 하는 방법.

【 청구항 11 】

제 1 항 또는 제 3 항에 있어서, 상기 바이러스 벡터에 삽입되는 외래 DNA 염기 서열은 HIV, HCV, HBV, HPV, HSV, 로타바이러스, 인플루엔자 바이러스 및 유행성 출혈열 바이러스로 구성된 그룹으로부터 선택되는 병원성 바이러스의 항원성 결정 부위를 코딩하는 서열인 것을 특징으로 하는 방법.

【 청구항 12 】

제 3 항에 있어서, 상기 삽입되는 외래 DNA 염기 서열은 플리오바이러스 재조합 벡터의 5'-말단에 삽입되는 것을 특징으로 하는 플리오바이러스 재조합 벡터내의 삽입 서열의 유전적 안정성을 개선하는 방법.

【 청구항 13 】

제 12 항에 있어서, 상기 삽입되는 외래 DNA 염기 서열은 플리오바이러스 재조합 벡터의 5'-말단에 인위적으로 형성된 1종 이상의 제한효소 절단부위를 포함하는 클로닝 부위에 삽입되는 것을 특징으로 하는 플리오바이러스 재조합 벡터내의 삽입 서열의 유전적 안정성을 개선하는 방법.

【 청구항 14 】

제 13 항에 있어서, 상기 플리오바이러스의 클로닝 부위의 3' 쪽에는 플리오바이러스의 지놈이 인코딩하는 3C-프로테아제가 인식할 수 있는 프로테아제 절단부위가 추가적으로 삽입되어 있는 것을 특징으로 하는 플리오바이러스 재조합 벡터내의 삽입 서열의 유전적 안정성을 개선하는 방법.

【 청구항 15 】

(a) 플리오바이러스 지놈 유전자; (b) 상기 지놈 유전자의 5' 쪽에 인위적으로 형성되어 있고 제한효소 절단 부위를 포함하는 클로닝 부위; 및 (c) 상기 플리오바이러스

지놈 유전자와 클로닝 부위의 사이에 인위적으로 형성된 3C-프로테아제 절단부위를 포함하는 사빈 1형 폴리오바이러스 재조합 벡터의 상기 클로닝 부위에 삽입되는 외래 DNA 염기 서열의 G/C 양의 분포를 전체 외래 DNA 염기 서열에 걸쳐 균일하게 하고 동시에 G/C 양을 40% 이상으로 증가되도록 변이시키는 단계를 포함하는 폴리오바이러스 재조합 벡터 내의 삽입 서열의 유전적 안정성을 개선하는 방법.

【 청구항 16 】

(a) 폴리오바이러스 지놈 유전자; (b) 상기 지놈 유전자의 5' 쪽에 인위적으로 형성되어 있고 제한효소 절단 부위를 포함하는 다중 클로닝 부위; 및 (c) 상기 폴리오바이러스 지놈 유전자와 클로닝 부위의 사이에 인위적으로 형성된 3C-프로테아제 절단부위를 포함하는 사빈 1형 폴리오바이러스 재조합 벡터의 상기 다중 클로닝 부위에 삽입되는 단백질 수준에서 반복된 아미노산 서열을 갖는 멀티머성 항원 결정부위를 인코딩하는 외래 DNA 염기 서열의 G/C 양의 분포를 전체 외래 DNA 염기 서열에 걸쳐 균일하게 하고 유전자 코드의 축퇴성을 이용하여 DNA 수준에서 반복된 염기 서열을 회피하도록 변이시키는 단계를 포함하는 폴리오바이러스 재조합 벡터내의 삽입 서열의 유전적 안정성을 개선하는 방법.

【 청구항 17 】

제 16 항에 있어서, 상기 변이가 있는 멀티머성 항원 결정부위를 인코딩하는 외래 DNA 염기 서열은 다음과 같은 단계들 포함하는 연결반응-부재 PCR 방법에 의해 제조됨을 특징으로 하는 플리오바이러스 재조합 벡터의 유전적 안정성을 개선하는 방법:

(i) 다음과 같은 특징을 갖으며 수형과 프라이머의 역할을 하는 다수의 DNA 단편을 합성하는 단계: (a) 상기 다수의 프라이머는 최종적으로 제조하고자 하는 멀티머성 항원 결정 부위를 인코딩하는 DNA 염기 서열을 적합한 크기로 분할하여 디자인된 것이고; (b) 상기 다수의 프라이머의 5'-및/또는 3'-말단은 다른 프라이머의 말단 서열에 대하여 상보적인 서열을 포함하며; (c) 상기 상보적인 서열은 8-20 머 길이와 35% 이상의 G/C 양을 갖고; (d) 증폭 단계에서 이용되는 양 말단의 프라이머는 제한효소 절단자리로 이루어진 클로닝 부위를 갖는다; (ii) 증폭 단계에서 이용되는 양 말단의 프라이머:나머지 프라이머의 농도비를 1:3-1:8로 하여 상기 합성된 다수의 프라이머를 혼합하는 단계;

(iii) 다음과 같은 연쇄적인 PCR 반응을 포함하는 원하는 크기의 멀티머성 항원 결정부위를 인코딩하는 외래 DNA 서열의 전장을 제조하는 숙성 단계: 92℃-96℃에서 20-40 초 동안의 변성, 25℃-40℃에서 20-40초 동안의 어닐링 및 68℃-75℃에서 30초-55초 동안의 합성 반응; 그리고,

(iv) 다음과 같은 연쇄적인 PCR 반응을 포함하는 상기 제조된 외래 DNA 서열의 전장을 증폭하는 단계: 92℃-96℃에서 20-40초 동안 변성, 68℃-75℃에서 40초-1분 10초 동안의 어닐링 및 합성 반응.

【 청구항 18 】

다음과 같은 단계를 포함하는 연결반응-부재 PCR 방법을 이용한 DNA 서열의 제조 및 증폭방법:

(i) 다음과 같은 특징을 갖으며 수형과 프라이머의 역할을 하는 다수의 DNA 단편을 합성하는 단계: (a) 상기 다수의 프라이머는 최종적으로 제조하고자 하는 DNA 염기서열을 적합한 크기로 분할하여 디자인된 것이고; 및 (b) 상기 다수의 프라이머의 5'- 및/또는 3'-말단은 다음 프라이머의 말단 서열에 대하여 상보적인 염기서열을 포함한다;

(ii) 증폭 단계에서 이용되는 양 말단의 프라이머를 나머지 프라이머와 비교하여 높은 농도로 하여 상기 합성된 다수의 프라이머를 혼합하는 단계;

(iii) 다음과 같은 연쇄적인 PCR 반응을 포함하는 원하는 크기의 멀티머성 항원 결정부위를 인코딩하는 외래 DNA 서열의 전장을 제조하는 숙성 단계: 92℃-96℃에서 20-40초 동안의 변성, 25℃-40℃에서 20-40초 동안의 어닐링 및 68℃-75℃에서 30초-55초 동안의 합성 반응; 그리고,

(iv) 다음과 같은 연쇄적인 PCR 반응을 포함하는 상기 제조된 DNA 서열의 전장을 증폭하는 단계: 92℃-96℃에서 20-40초 동안의 변성, 68℃-75℃에서 40초-1분 10초 동안의 어닐링 및 합성 반응.

【 청구항 19 】

제 18 항에 있어서, 상기 혼합 단계에서 혼합되는 증폭 단계에서 이용되는 양 말단의 프라이머와 나머지 프라이머의 농도비는 1:3-1:8인 것을 특징으로 하는 연결반응-부재 PCR 방법을 이용한 DNA 서열의 제조 및 증폭방법.

【 청구항 20 】

제 18 항에 있어서, 상기 프라이머의 5'- 및/또는 3'-말단에 있는 상보적인 염기서열은 길이가 8-20 머이고, G/C 양이 35% 이상인 것을 특징으로 하는 연결반응-부재 PCR 방법을 이용한 DNA 서열의 제조 및 증폭방법.

【 청구항 21 】

제 18 항에 있어서, 상기 다수의 프라이머 중 증폭 단계에서 이용되는 양 말단의 프라이머는 제한효소 절단자리로 이루어진 클로닝 부위를 갖는 것을 특징으로 하는 연결반응-부재 PCR 방법을 이용한 DNA 서열의 제조 및 증폭방법.

【 청구항 22 】

외래 DNA 서열을 포함하는 단일쇄 RNA 바이러스 재조합 벡터에 있어서, 상기 외래 DNA 서열은 그 유전적 안정성을 개선하기 위하여 상기 외래 DNA 염기 서열의 G/C 양의 분포를 전체 외래 DNA 서열에 걸쳐 균일하게 분포되도록 변이된 것이고, 상기 단일쇄 RNA 바이러스 재조합 벡터는 폴리오바이러스 벡터, 황열 바이러스 벡터, 베네수엘라 에퀀 엔세팔리티스 바이러스 벡터, 루벨라 바이러스 벡터 및 콕사키 바이러스 벡터로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 외래 DNA 서열의 유전적 안정성이 개선된 단일쇄 RNA 바이러스 재조합 벡터.

【 청구항 23 】

제 22 항에 있어서, 상기 변이에 의해 G/C 양이 증가된 외래 DNA 염기 서열의 G/C 양은 전체 외래 DNA 염기 서열에 대하여 40% 이상이고, 상기 외래 DNA 염기 서열의 길이는 450 bp 이하인 것을 특징으로 하는 단일쇄 RNA 바이러스 재조합 벡터.

【 청구항 24 】

외래 DNA 서열을 포함하는 폴리오바이러스 재조합 벡터에 있어서, 상기 외래 DNA 서열은 그 유전적 안정성을 개선하기 위하여 상기 외래 DNA 염기 서열의 G/C 양의 분포를 전체 외래 DNA 서열에 걸쳐 균일하게 분포되도록 변이된 것이고, 상기 폴리오바이러스 재조합 벡터는 폴리오바이러스 1형, 폴리오바이러스 2형 및 폴리오바이러스 3형으로

구성된 그룹으로부터 선택되는 폴리오 바이러스로부터 유래된 것임을 특징으로 하는 외래 DNA 서열의 유전적 안정성이 개선된 폴리오바이러스 재조합 벡터.

【 청구항 25 】

제 24 항에 있어서, 상기 변이된 외래 DNA 염기 서열의 G/C 양은 전체 외래 DNA 염기 서열에 대하여 40% 이상인 것을 특징으로 하는 외래 DNA 서열의 유전적 안정성이 개선된 폴리오바이러스 재조합 벡터.

【 청구항 26 】

제 24 항 또는 제 25 항에 있어서, 상기 외래 DNA 염기 서열의 길이는 450 bp 이하인 것을 특징으로 하는 외래 DNA 서열의 유전적 안정성이 개선된 폴리오바이러스 재조합 벡터.

【 청구항 27 】

제 24 항에 있어서, 상기 폴리오바이러스 재조합 벡터는 사빈 1형, 사빈 2형 및 사빈 3형으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 사빈형 바이러스로부터 유래된 것을 특징으로 하는 외래 DNA 서열의 유전적 안정성이 개선된 폴리오바이러스 재조합 벡터.

【 청구항 28 】

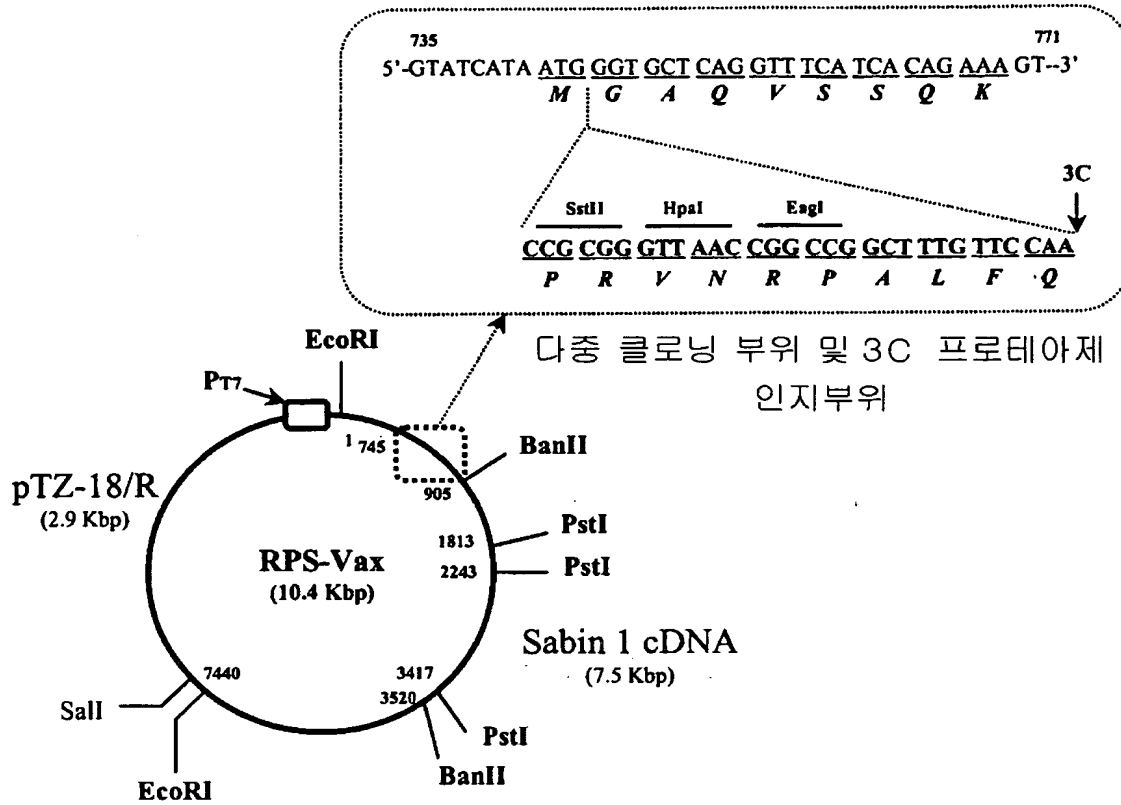
제 24 항에 있어서, 상기 외래 DNA 염기 서열은 플리오바이러스 재조합 벡터의 5'-말단에 인위적으로 형성된 1종 이상의 제한효소 절단부위를 포함하는 클로닝 부위에 삽입되는 것을 특징으로 하는 외래 DNA 서열의 유전적 안정성이 개선된 플리오바이러스 재조합 벡터.

【 청구항 29 】

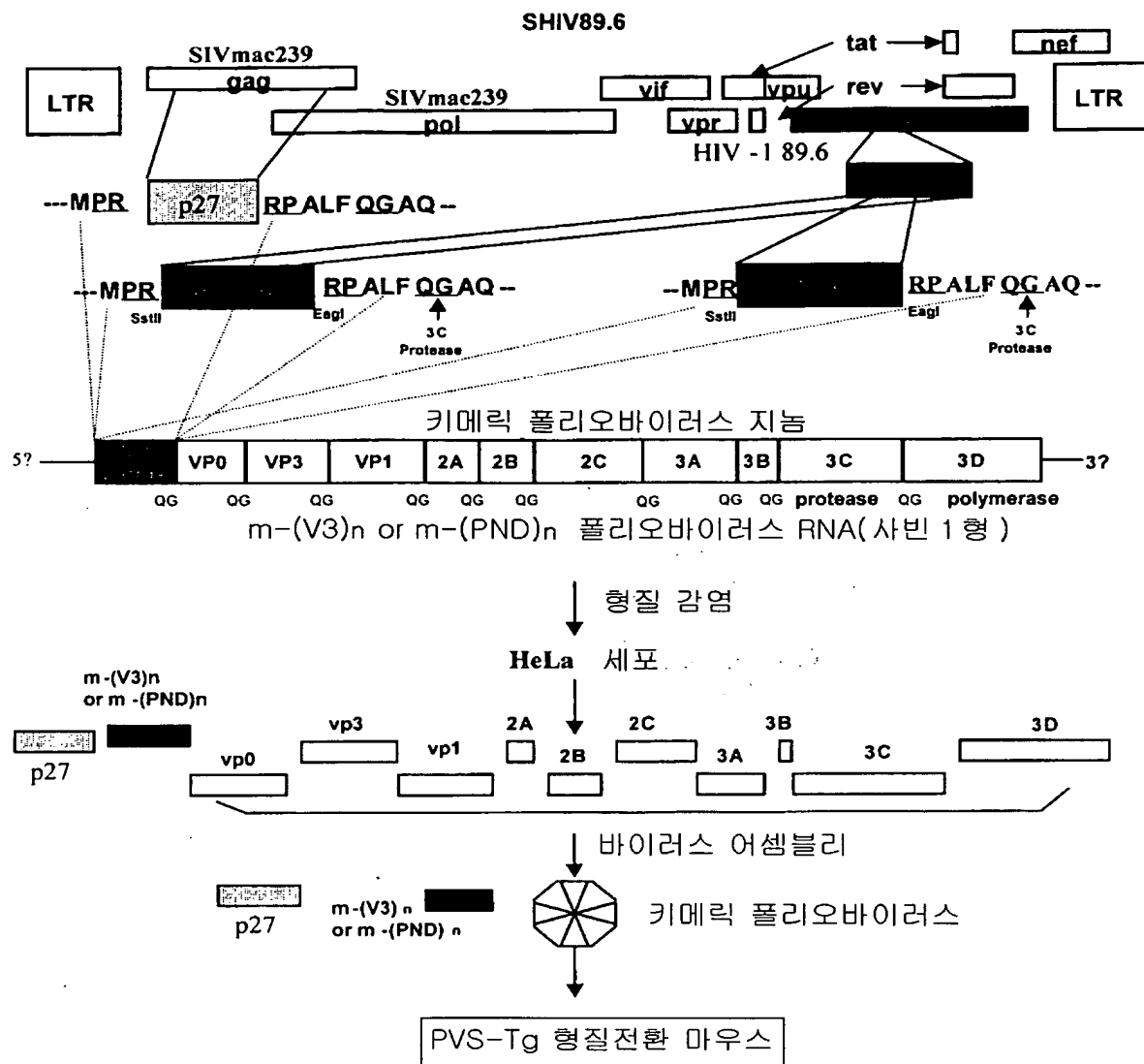
제 28 항에 있어서, 상기 플리오바이러스의 클로닝 부위의 3' 쪽에는 플리오바이러스의 지놈이 인코딩하는 3C-프로테아제가 인식할 수 있는 프로테아제 절단부위가 추가적으로 삽입되어 있는 것을 특징으로 하는 외래 DNA 서열의 유전적 안정성이 개선된 플리오바이러스 재조합 벡터.

【 도면 】

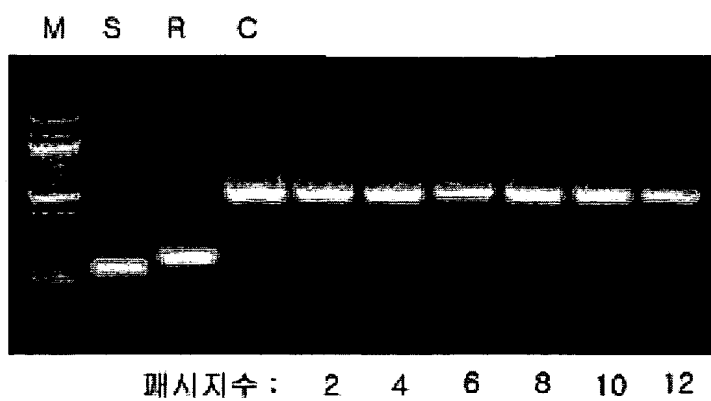
【 도 1 】



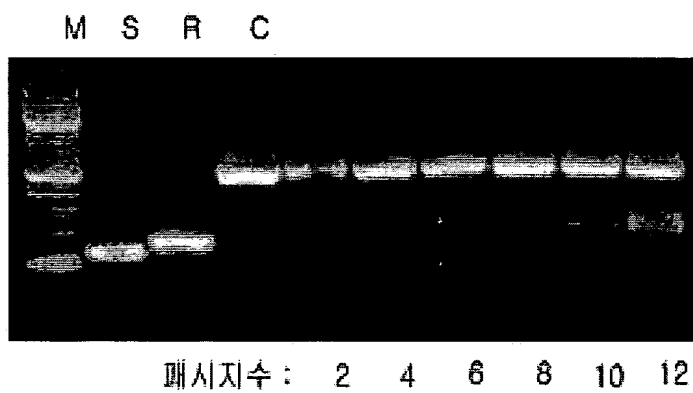
【 도 2 】



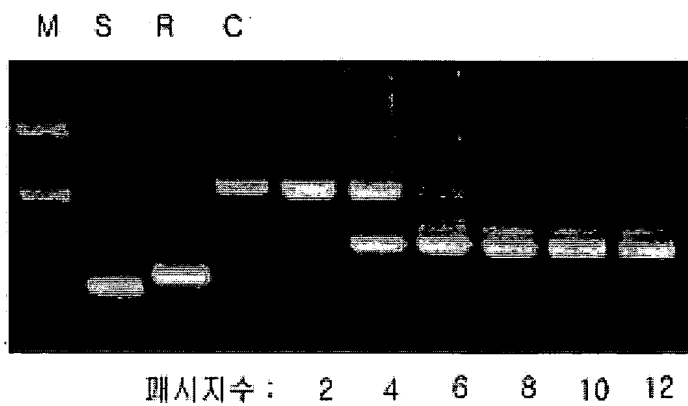
【 도 3a 】



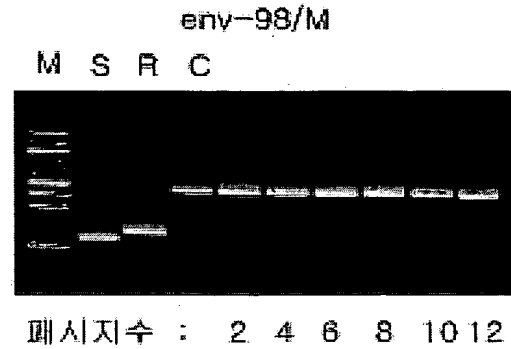
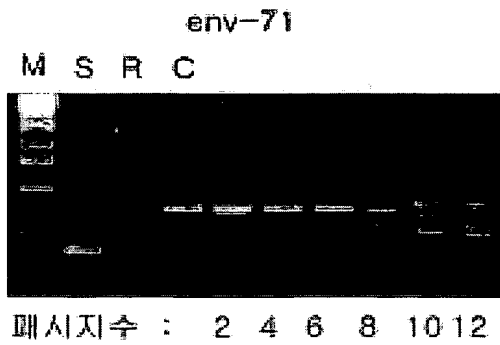
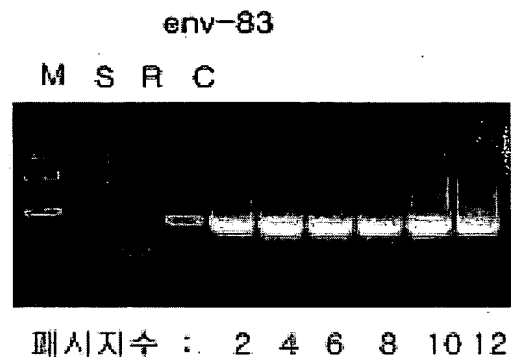
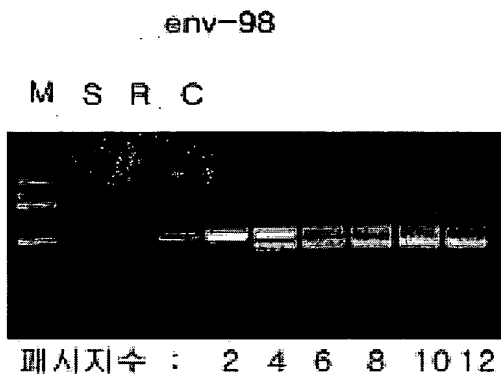
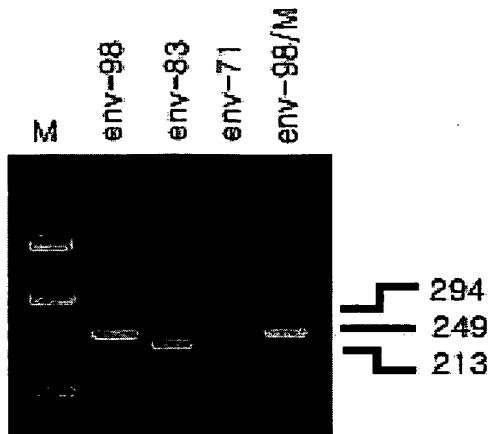
【 도 3b 】



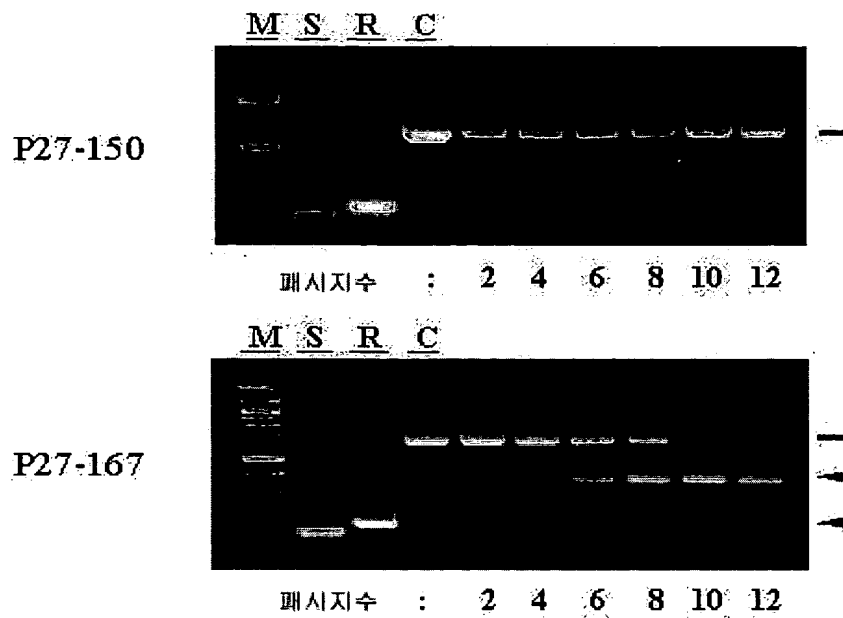
【 도 3c 】



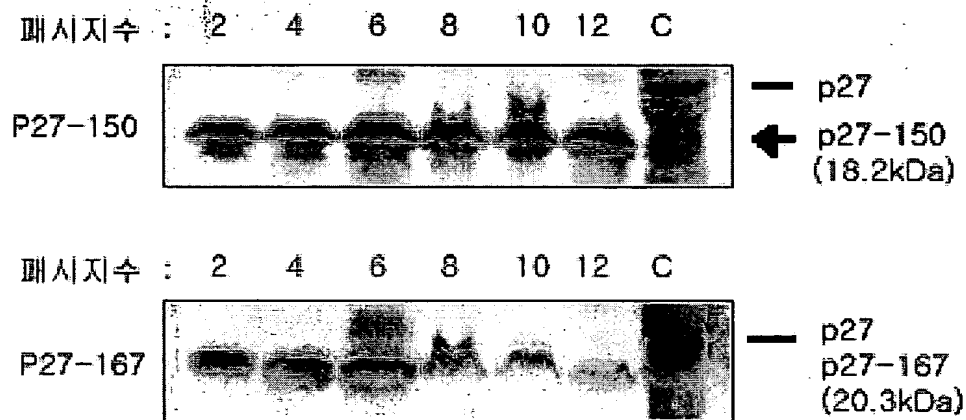
【 도 5 】



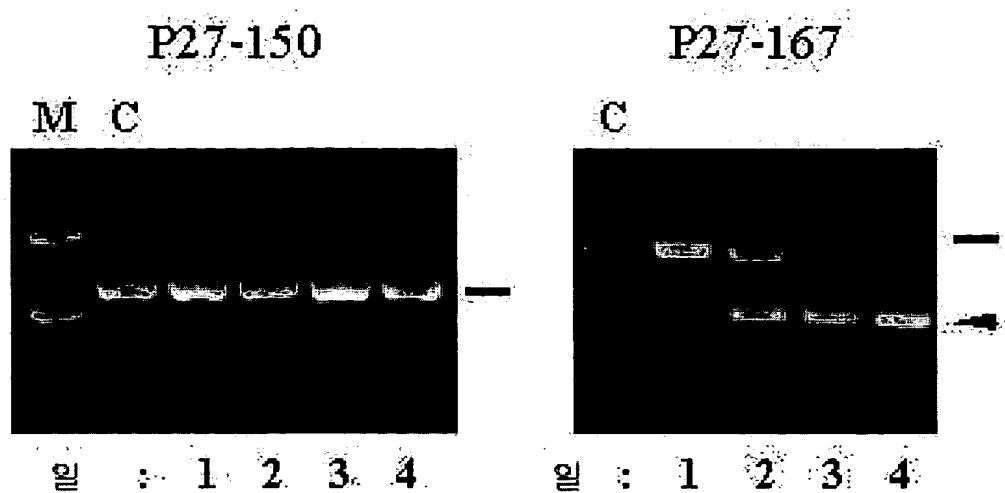
【 도 6a 】



【 도 6b 】



【 도 7 】



【 도 8 】

1	A	K	A	V	A	A	W	T	L	K	A	A	A	G	Q	15
1	GCT	AAG	GCC	GTT	GCA	GCC	TGG	ACC	CTG	AAA	GCC	GCT	GCA	GGC	CAA	45
16	A	S	T	E	G	D	C	G	C	P	A	I	I	E	V	30
46	GCC	TCC	ACC	GAA	GGC	GAC	TGC	GGT	TGC	CCA	<u>GCC</u>	<u>ATC</u>	<u>ATC</u>	<u>GAG</u>	<u>GTC</u>	90
31	<u>D</u>	<u>N</u>	<u>D</u>	<u>A</u>	<u>P</u>	<u>T</u>	<u>K</u>	<u>R</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>K</u>	<u>L</u>	F	S	E	45
91	<u>GAT</u>	<u>AAC</u>	<u>GAT</u>	<u>GCC</u>	<u>CCT</u>	<u>ACC</u>	<u>AAG</u>	<u>CGA</u>	<u>GCC</u>	<u>AGC</u>	<u>AAG</u>	<u>CTC</u>	TTC	AGC	GAA	135
46	F	E	V	D	<u>N</u>	<u>E</u>	<u>Q</u>	<u>P</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>R</u>	<u>A</u>	<u>Q</u>	<u>K</u>	L	60
136	TTC	GAG	GTC	GAT	<u>AAT</u>	<u>GAG</u>	<u>CAG</u>	<u>CCC</u>	<u>ACT</u>	<u>ACC</u>	<u>CGA</u>	<u>GCC</u>	<u>CAG</u>	<u>AAG</u>	<u>CTC</u>	180
61	F	A	M	W	R	I	T	Y	K	<u>D</u>	<u>N</u>	<u>D</u>	<u>A</u>	<u>P</u>	<u>T</u>	75
181	TTC	GCC	ATG	TGG	CGT	ATC	ACT	TAC	AAG	<u>GAC</u>	<u>AAT</u>	<u>GAT</u>	<u>GCG</u>	<u>CCA</u>	<u>ACT</u>	225
76	<u>K</u>	<u>R</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>K</u>	<u>L</u>	C	V	R	I	Y	M	K	P	K	90
226	<u>AAG</u>	<u>CGC</u>	<u>GCA</u>	<u>TCT</u>	<u>AAA</u>	<u>CTG</u>	TGC	GTC	CGA	ATC	TAC	ATG	AAG	CCC	AAG	270
91	H	V	R	C	S	G	C	P	A	I	I	E	V	<u>D</u>	<u>N</u>	105
271	CAC	GTT	CGA	TGC	TCC	GGC	TGT	CCC	<u>GCT</u>	<u>ATT</u>	<u>ATC</u>	<u>GAA</u>	<u>GTG</u>	<u>GAT</u>	<u>AAC</u>	315
106	<u>D</u>	<u>A</u>	<u>P</u>	<u>T</u>	<u>K</u>	<u>R</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>K</u>	<u>L</u>	<u>D</u>	<u>N</u>	<u>Y</u>	<u>Q</u>	<u>S</u>	120
316	<u>GAC</u>	<u>GCA</u>	<u>CCA</u>	<u>ACC</u>	<u>AAA</u>	<u>CGG</u>	<u>GCA</u>	<u>TCA</u>	<u>AAG</u>	<u>CTG</u>	<u>GAC</u>	<u>AAC</u>	<u>TAC</u>	<u>CAG</u>	<u>TCC</u>	360
121	P	C	A	I	<u>N</u>	<u>E</u>	<u>Q</u>	<u>P</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>R</u>	<u>A</u>	<u>Q</u>	<u>K</u>	S	135
361	CCA	TGC	GCG	ATC	<u>AAC</u>	<u>GAG</u>	<u>CAA</u>	<u>CCT</u>	<u>ACC</u>	<u>ACC</u>	<u>CGT</u>	<u>GCG</u>	<u>CAA</u>	<u>AAG</u>	<u>TCC</u>	405
136	A	G	C	F	Y	Q	T	R	V	V	V	P	S	G	C	150
406	GCT	GGG	TGC	TTC	TAT	CAG	ACC	CGC	GTC	GTG	GTT	CCC	TCA	GGT	TGT	450

- : 랜싱 (폴리오바이러스 2형) VIP 중화에피토프
 : 레온 (폴리오바이러스 3형) VIP 중화에피토프
 : 다양한 코돈사용에 의한 코딩서열의 다양성 부위

【 도 9 】

프라이머 1 →

5-ATTATA CCGCGG-
(Sst II)

10	20	30	40	50	60
GCTAAGGCCG	TTGCAGCCTG	GACCCTGAAA	GCCGCTGCAG	GCCAAGCCTC	CACCGAAGGC
					3'-GTGGCTTCCG

프라이머 3 →

70	80	90	100	110	120
GA	CTG-3'			5'-ACCAA	GCGAGCCAGC
CTGACGCCAA	CGGGTCGGTA	G	TAGCTCCAG	CTATTGCTAC	GGGGATGGTT
					CGCTCGGTCG-5'

← 프라이머 2

130	140	150	160	170	180
AAGCTCTTCA	GCGAATTCGA	GGTCGATAAT	GAGCAGCCCA	CTACCCGAGC	CCAGA-3'
					3'-GATGGGCTCG
					GGTCTTCGAG

프라이머 5 →

190	200	210	220	230	240
AAGCGGTACA	CCGCATAGTG	AATGTTCTCTG	TTACTACGCG	GTTGATTTCGC-5'	
					5'-TGCGC
					CAACTAAGCG
					CGCATCTAAA

← 프라이머 4

250	260	270	280	290	300
CTGTGCGTCC	GAATCTACAT	GAAGCCCAAG	CACGTTTCGAT	GCTCC-3'	
					3'-GTGCAAGCTA
					CGAGGCCGAC
					AGGGCGATAA

프라이머 7 →

310	320	330	340	350	360
TAGCTTCACC	TATTGCTGCG	TGGTTGGTTT	GCCCGTAGTT-5'		
					5'-CCAAA
					CGGGCATCAA
					AGCTGGACAA
					CTACCAGTCC

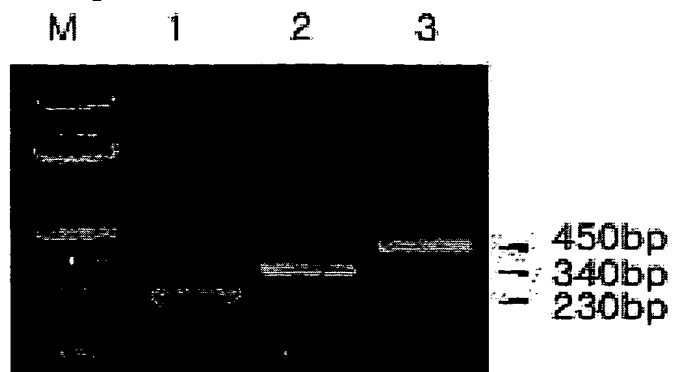
← 프라이머 6

370	380	390	400	410	420
CCATGCGCGA	TCAACGAGCA	ACCTACCACC	CGTGC-3'		
					3'-TGGATGGTGG
					GCACGCGTTT
					TCAGGCGACC
					CACGAAGATA

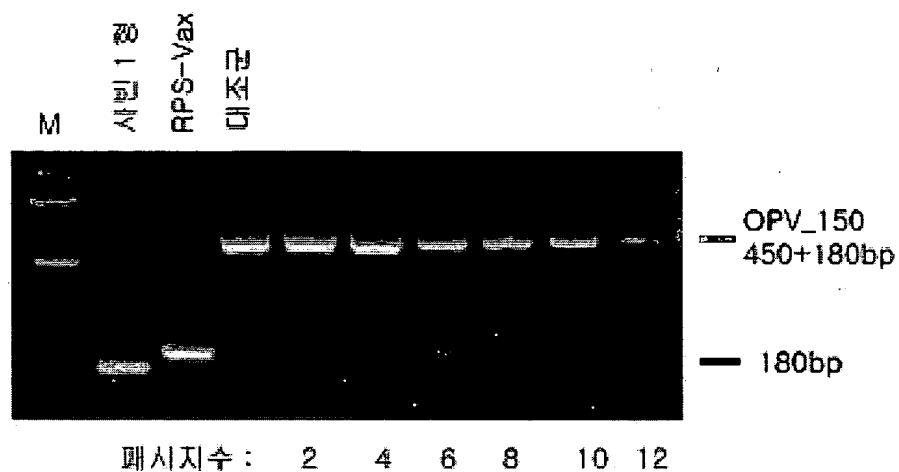
430	440	450
GTCTGGGCGC	AGCACCAAGG	GAGTCCAACA
		<u>GCCGGC</u>
		AATTAT-5'

(Eag I) ← 프라이머 8

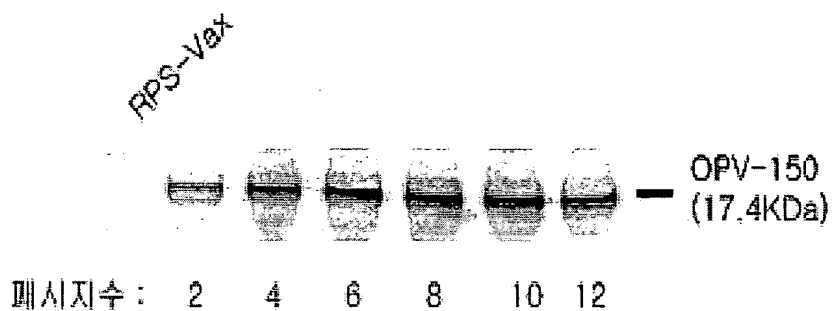
【 도 10 】



【 도 11a 】



【 도 11b 】



【 서열목록 】

<110> CreaGene Inc. <120> Method for Improving a Genetic Stability for
the Insert in Single-Stranded RNA Virus Recombinant Vectors <130>

CreaGene-1 <160> 22 <170> KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 300 <212>
 DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> SIV gag-100 <400> 1
 agccccgagaa cattaaatgc ctgggtaaaa ttgatagagg aaaagaaatt tggagcagaa 60
 gtagtgccag gatttcaggc actgtcagaa ggttgcaccc cctatgacat taatcagatg 120
 ttaaattgtg tgggagacca tcaagcggct atgcagatta tcagagatat tataaacgag 180
 gaggctgcag attgggactt gcagcaccca caaccagctc cacaacaagg acaacttagg 240
 gagccgtcag gatcagatat tgcaggaaca actagttcag tagatgaaca aatccagtgg 300
 300 <210> 2 <211> 342 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <
 223> SIV gag-114 <400> 2 ccagtacaac aaataggtgg taactatgtc cacctgccat
 taagccccgag aacattaaat 60 gcctgggtaa aattgataga ggaaaagaaa tttggagcag
 aagtagtgcc aggatttcag 120 gcactgtcag aaggttgcac ccctatgac attaatcaga
 tgttaaattg tgtgggagac 180 catcaagcgg ctatgcagat tatcagagat attataaacg
 aggaggctgc agattgggac 240 ttgcagcacc cacaaccagc tccacaacaa ggacaactta
 gggagccgtc aggatcagat 300 attgcaggaa caactagttc agtagatgaa caaatccagt gg
 342 <210> 3 <211> 501 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <
 223> SIV p27-167 <400> 3 ccagtacaac aaataggtgg taactatgtc cacctgccat
 taagccccgag aacattaaat 60 gcctgggtaa aattgataga ggaaaagaaa tttggagcag
 aagtagtgcc aggatttcag 120 gcactgtcag aaggttgcac ccctatgac attaatcaga
 tgttaaattg tgtgggagac 180 catcaagcgg ctatgcagat tatcagagat attataaacg
 aggaggctgc agattgggac 240 ttgcagcacc cacaaccagc tccacaacaa ggacaactta
 gggagccgtc aggatcagat 300 attgcaggaa caactagttc agtagatgaa caaatccagt


```

ggatgtacag acaacagaac      360 cccataccag taggcaacat ttacaggaga tggatccaac
tggggttgca aaaatgtgtc     420 agaatgtata acccaacaaa cattctagat gtaaaacaag
ggccaaaaga gccatttcag     480 agctatgtag acaggttcta c
501 <210>      4 <211>      450 <212>      DNA <213>      Artificial Sequence <220> <
223>      SIV p27-150 <400>      4 ccagtacaac aaataggtgg taactatgtc cacctgccat
taagccccgag aacattaaat     60 gcctgggtaa aattgataga ggaaaagaaa tttggagcag
aagtagtgcc aggatttcag     120 gcactgtcag aaggttgac cccctatgac attaatacaga
tgttaaattg tgtgggagac     180 catcaagcgg ctatgcagat tatcagagat attataaacg
aggaggctgc agattgggac     240 ttgcagcacc cacaaccagc tccacaacaa ggacaactta
gggagccgtc aggatcagat     300 attgcaggaa caactagttc agtagatgaa caaatccagt
ggatgtacag acaacagaac     360 cccataccag taggcaacat ttacaggaga tggatccaac
tggggttgca aaaatgtgtc     420 agaatgtata acccaacaaa cattctagat
450 <210>      5 <211>      324 <212>      DNA <213>      Artificial Sequence <220> <
223>      SIV env-108 <400>      5 acttctactt ggtttggctt taatggaact agagcagaaa
atagaactta tatttactgg     60 catggtaggg ataataggac tataattagt ttaaataagt
attataatct aacaatgaaa     120 tgtagaagac caggaaataa gacagtttta ccagtcacca
ttatgtctgg attggttttc     180 cactcacaac caatcaatga taggccaaag caggcatggt
gttggtttgg aggaaaatgg     240 aaggatgcaa taaaagaggt gaagcagacc attgtcaaac
atcccaggta tactggaact     300 aacaatactg ataaaatcaa ttig
324 <210>      6 <211>      294 <212>      DNA <213>      Artificial Sequence <220> <
223>      HIV-1 env-98 <400>      6 ttaaatggca gtctagcaga agaagacata gtaattagat

```

ctgaaaattt cacagacaat 60 gctaaaacca taatagtaca gctaaatgaa tctgtagtaa
 ttaattgtac aagacccaac 120 aacaatacaa gaagaaggtt atctatagga ccaggaggag
 catTTtatgc aagaagaaac 180 ataataggag atataagaca agcacattgt aacattagta
 gagcaaaatg gaataacact 240 ttacaacaga tagttataaa attaagagaa aaatttagga
 ataaaacaat agcc 294 <210> 7 <211> 249 <212> DNA <213>

Artificial Sequence <220> <223> HIV-1 env-83 <400> 7 ttaaattggca

gtctagcaga agaagacata gtaattagat ctgaaaattt cacagacaat 60 gctaaaacca
 taatagtaca gctaaatgaa tctgtagtaa ttaattgtac aagacccaac 120 aacaatacaa
 gaagaaggtt atctatagga ccaggaggag catTTtatgc aagaagaaac 180 ataataggag
 atataagaca agcacattgt aacattagta gagcaaaatg gaataacact 240 ttacaacag

249 <210> 8 <211> 213 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <

223> HIV-1 env-71 <400> 8 ctaaattgaat ctgtagtaat taattgtaca agacccaaca
 acaatacaag aagaaggtta 60 tctataggac caggaggagc attttatgca agaagaaaca
 taataggaga tataagacaa 120 gcacattgta acattagtag agcaaaatgg aataacactt
 tacaacagat agttataaaa 180 ttaagagaaa aatttaggaa taaaacaata gcc

213 <210> 9 <211> 294 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <

223> HIV-1 env-98/M <400> 9 ttaaattggca gtctagcaga agaagacata gtaattagat
 ctgaaaattt cacagacaat 60 gctaaaacca taatagtaca gctaaatgaa tctgtagtaa
 ttaattgtac aagacccaac 120 aacaatacaa gaagaaggtt atctatagga ccaggaggag
 catTTtatgc aagaagaaac 180 ataataggag atataagaca agcacattgt aacattagta
 gagcaaaatg gaataacact 240 ttacaacaga tctgtatcaa gcttcgggag aagttccgga

```

acaagacgat cgcc                294 <210>    10 <211>    381 <212>    DNA <213>
Artificial Sequence <220> <223>    PV 2-127 <400>    10 gcgctgacag ccgtagagac
aggggccacc aaccattgg tgccttcaga cacggtacaa                60 actcgtcacg tcatccaaaa
gcggacgcgg tcggagtcta cggttgagtc tttcttcgca                120 agaggagctt gtgtggccat
tattgaagtg gataatgatg ctccaacaag gcgtgccagt                180 aaattatfff cagtctggaa
gataacttac aaggacaccg ttcagttaag acgtaagttg                240 gaggttcttta catattcaag
gtttgacatg gagttcacct ttgtgggttac atccaattat                300 accgatgcaa acaatgggca
cgcactgaat caagtttacc agataatgta cataccacct                360 ggggcaccga tccctggcaa g
381 <210>    11 <211>    354 <212>    DNA <213>    Artificial Sequence <220>
<223>    PV 2-118 <400>    11 gcttgtgtgg ccattattga agtggataat gatgctccaa
caaggcgtgc cagtaaatta                60 ttttcagtct ggaagataac ttacaaggac accgttcagt
taagacgtaa gttggagttc                120 ttacatatt caaggtttga catggagttc acctttgtgg
ttacatccaa ttataccgat                180 gcaaacaatg ggcacgcact gaatcaagtt taccagataa
tgtacatacc acctggggca                240 ccgatccctg gcaagcggaa tgattacaca tggcaaacgt
catctaacc atcagtgttt                300 tacacttacg gggcacctcc agctagaata tcagtgcctt
acgtgggcat tgcc                354 <210>    12 <211>    330 <212>    DNA <213>
Artificial Sequence <220> <223>    PV 3-110 <400>    12 cacgtagtcc aacgacgcag
caggtcagag tccacaatag aatcattctt cgcacgcggg                60 gcgtgcgtcg ctattattga
ggtggacaat gaacaaccaa ccacccgggc acagaaacta                120 ttgccaatgt ggcgattac
atacaaagat acagtgcagt tgcgccgtaa gttggagttt                180 ttacatact ctcgttttga
catggaattc accttcgtgg taaccgcaa cttaccaaac                240 gctaataatg ggcatgcact

```

```

caaccaggtg taccagataa tgtacatccc cccaggggca      300 cccacaccaa agtcatggga
cgactacact      330 <210>      13 <211>      480

<212>      DNA <213>      Artificial Sequence <220> <223>      HCV core-160 <400>
13 atgagcacia atcctaaacc tcaaagaaaa accaaaagaa acaccaaccg tcgcccacaa      60
gacgtcaagt tcccgggagg tggtcagatc gttggtggag ttacctgtt gccgcgcagg      120
ggccccagggt tgggtgtgag cgcgactagg aagacttccg agcggtcgca acctcgtgga      180
aggcgacagc ctatcccaaa ggctcgccaa cccgagggtg ggacctgggc tcagcccggg      240
tacccttggc ccctctatgg caatgagggt ctgggatggg caggatggct cctgtcacc      300
cgcggtcttc ggcctagtgt gggccccaca gacccccggc gtaggtcgcg taatttgggt      360
aaggtcacg atactctcac atgcggcttc gccgacctca tggggtacat tccgctcgtc      420
ggcgcccccc tagggggcgt tgccagggcc ttggcacatg gtgtccggct tctggaggac      480
480 <210>      14 <211>      300 <212>      DNA <213>      Artificial Sequence <220>
<223>      HCV core-100 <400>      14 atgagcacia atcctaaacc tcaaagaaaa accaaaagaa
acaccaaccg tcgcccacaa      60 gacgtcaagt tcccgggagg tggtcagatc gttggtggag
ttacctgtt gccgcgcagg      120 ggccccagggt tgggtgtgag cgcgactagg aagacttccg
agcggtcgca acctcgtgga      180 aggcgacagc ctatcccaaa ggctcgccaa cccgagggtg
ggacctgggc tcagcccggg      240 tacccttggc ccctctatgg caatgagggt ctgggatggg
caggatggct cctgtcacc      300
300 <210>      15 <211>      399 <212>      DNA <213>      Artificial Sequence <220>
<223>      PV 2.3-131 <400>      15 gcgctgacag ccgtagagac agggggccacc aaccattgg
tgccttcaga cacggtacaa      60 actcgtcacg tcattcaaaa gcggacgcgg tcggagtcta

```

cggttgagtc tttcttcgca	120 agaggagcctt gtgtggccat tattgaagtg gataatgatg
ctccaacaag gcgtgccagt	180 aaattatittt cagtctggaa gataactgaa ttcgagtcca
caatagaatc attcttcgca	240 cgcggggcgt gcgtcgctat tattgagggtg gacaatgaac
aaccaaccac ccgggcacag	300 aaactatittg ccatgtggcg cattacatac aaagatacag
tgcagttgcg ccgtaagttg	360 gagttitttca catactctcg ttttgacatg gaattcacc
399 <210> 16 <211> 336 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220>	
<223> PV 2.3-112 <400>	16 gcttgtgtgg ccattattga agtggataat gatgctccaa
caaggcgtgc cagtaaatta	60 ttttcagtct ggaagataac ttacaaggac accgttcagt
taagacgtaa gttggagttc	120 ttacatatt caaggtttga catggagttc acctttgtgg
ttacaggatc cgcgtgcgtc	180 gctattattg aggtggacaa tgaacaacca accacccggg
cacagaaact atttgccatg	240 tggcgcatta catacaaaga tacagtgcag ttgcgccgta
agttggagtt tttcacatac	300 tctcgttttg acatggaatt caccttcgtg gtaacc
336 <210> 17 <211> 306 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220>	
<223> HBV C.S <400>	17 ttgtggtttc acatttcctg tcttacgttt gggagacaaa
ctgttcttga atatttggtg	60 tcctttggag tgtggattcg cactcctcct gcatatagac
caccaaagtc ccctatctta	120 tcaacacttc cggaaactac tgttggttaga gaattcccag
gatcatcaac caccagcacg	180 ggaccatgca agacttgcac agctcctgct caaggaacct
ctatgtttcc ctcatgttgc	240 tgtacaaaac ctacggacgg aaactgcacc tgtattccca
tcccatcatc ttgggctttc	300 gcaaaa
306 <210> 18 <211> 360 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220>	
<223> HIV-1 mV3 <400>	18 attaattgta caagacccaa caacaataca agaagaaggt

tatctatagg accagggaga	60 gcattttatg caagaagaaa cataatagga gatataagac
aagcacattg taacattgaa	120 ttcattaatt gtacaagacc caacaacaat acaagaagaa
ggttatctat aggaccagg	180 agagcatttt atgcaagaag aaacataata ggagatataa
gacaagcaca ttgtaacatt	240 ctgcagatta attgtacaag acccaacaac aatacaagaa
gaaggttatc tataggacca	300 gggagagcat tttatgcaag aagaaacata ataggagata
taagacaagc acattgtaac	360
360 <210> 19 <211> 240 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220>	
<223> HIV-1 PND8 <400>	19 tctataggac cagggagagc attttatgca tctataggac
cagggagagc attttatgca	60 tctataggac cagggagagc attttatgca tctataggac
cagggagagc attttatgca	120 tctataggac cagggagagc attttatgca tctataggac
cagggagagc attttatgca	180 tctataggac cagggagagc attttatgca tctataggac
cagggagagc attttatgca	240
240 <210> 20 <211> 450 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220>	
<223> OPV-150 <400>	20 gctaaggccg ttgcagcctg gaccctgaaa gccgctgcag
gccaaagcctc caccgaaggc	60 gactgcggtt gccagccat catcgaggtc gataacgatg
cccctaccaa gcgagccagc	120 aagctcttca gcgaattcga ggtcgataat gaggagccca
ctacccgagc ccagaagctc	180 ttcgccatgt ggcgtatcac ttacaaggac aatgatgcgc
caactaagcg cgcattctaaa	240 ctgtgcgtcc gaatctacat gaagcccaag cacgttcgat
gctccggctg tcccgtatt	300 atcgaagtgg ataacgacgc accaaccaaa cgggcatcaa
agctggacaa ctaccagtcc	360 ccatgcgcga tcaacgagca acctaccacc cgtgcgcaaa
agtcgcgtgg gtgcttctat	420 cagacccgcg tcgtggttcc ctcaggttgt

```

450 <210>      21 <211>      411 <212>      DNA <213>      Artificial Sequence <220>
<223>      OPV-137 <400>      21 ttctaccaga cgcgagtggg tgtcccagac aacgaacagc
cgactacccg ggcaggccaa          60 gcctccaccg aaggcgactg cggttgccca gccatcatcg
aggtcgataa tgagcagccc          120 actacccgag ccagaagct cttcgccatg tggcgtatca
cttacaagga caatgatgcg          180 ccaactaagc gcgcatctaa actgtgcgtc cgaatctaca
tgaagcccaa gcacgttcga          240 tgctccggct gtcccgctat tatcgaagtg gataacgacg
caccaaccaa acgggcatca          300 aagctggaca actaccagtc cccatgcgcg atcaacgagc
aacctaccac ccgtgcgcaa          360 aagtccgctg ggtgcttcta tcagacccgc gtcgtggttc
cctcaggttg t                    411 <210>      22 <211>      396 <212>      DNA <213>
Artificial Sequence <220> <223>      OPV-132 <400>      22 gctaaggccg ttgcagcctg
gaccctgaaa gccgctgcag gccaaagcctc caccgaaggc          60 gactgcgggt gccagccat
catcgaggtc gataatgagc agcccactac ccgagcccag          120 aagctcttcg ccatgtggcg
tatcacttac aaggacaatg atgcgccaac taagcgcgca          180 tctaaactgt gcgtccgaat
ctacatgaag cccaagcacg ttcgatgctc cggctgtccc          240 gctattatcg aagtggataa
cgacgcacca accaaacggg catcaaagct ggacaactac          300 cagtcccatc gcgcgatcaa
cgagcaacct accacccgtg cgcaaaagtc cgctgggtgc          360 ttctatcaga cccgcgtcgt
ggttcctca ggttgt                    396

```